

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2003164282  
PUBLICATION DATE : 10-06-03

APPLICATION DATE : 29-11-01  
APPLICATION NUMBER : 2001365153

APPLICANT : GIFU UNIV;

INVENTOR : EZAKI TAKAYUKI;

INT.CL. : C12N 15/09 C12Q 1/68 G01N 33/53 G01N 33/566 G01N 33/569

TITLE : METHOD FOR DETECTING MICROORGANISM AND PRIMER SET FOR DETECTING THE SAME

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting microorganisms by amplifying the genes of the microorganisms under a common condition using plural kinds of microorganisms being pathogens causing a diarrheal disease and a food poisoning as a detecting object, and a primer set used for the method.

SOLUTION: A process for providing a primer set designed so that a target gene region is amplified under the determined temperature cycling condition and together with predetermining a temperature cycling condition in an amplifying reaction of the PCR method to a constant condition for each of the plural kinds of microorganisms as an object to be detected, and a process for performing the amplifying reaction under the determined common temperature cycling condition by respectively using the prepared plural kinds of primer set to a specimen supposed to contain at least one kind of the microorganism as the object to be detected are prepared. In the case that highly sensitive detection is an object, the nested PCR method is used.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-164282

(P2003-164282A)

(43) 公開日 平成15年6月10日 (2003.6.10)

|                           |       |                 |              |
|---------------------------|-------|-----------------|--------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I             | テ-マ-ト* (参考)  |
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 Q 1/68    | A 4 B 0 2 4  |
| C 1 2 Q 1/68              |       | G 0 1 N 33/53   | M 4 B 0 6 3  |
| G 0 1 N 33/53             |       | 33/566          |              |
| 33/566                    |       | 33/569          | F            |
| 33/569                    |       | C 1 2 N 15/00   | Z N A A      |
|                           |       | 審査請求 未請求 請求項の数3 | O L (全 69 頁) |

(21) 出願番号 特願2001-365153(P2001-365153)

(22) 出願日 平成13年11月29日 (2001.11.29)

(71) 出願人 594147501

株式会社ラカン

岐阜県岐阜市宇佐3丁目17番7号

(71) 出願人 391012257

岐阜大学長

岐阜県岐阜市柳戸1番1

(72) 発明者 江崎 孝行

岐阜県岐阜市加納永井町1-18-2

(74) 代理人 100098224

弁理士 前田 勘次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の検出方法、及び微生物の検出用プライマーセット

(57) 【要約】

【課題】 複数種類の下痢症状及び食中毒の原因菌となる微生物を検出対象として、微生物の遺伝子を共通の条件で増幅させて検出することができる微生物の検出方法、及びその方法に用いられるプライマーセットを提供する。

【解決手段】 P C R法の増幅反応における温度サイクル条件を予め一定条件に設定するとともに、設定された温度サイクル条件下で、標的とされる遺伝子領域が増幅されるように設計されたプライマーセットを、検出対象とする複数種類の微生物のそれぞれについて準備する工程と、検出対象とされる少なくとも1種類の微生物を含むと思われる試料につき、準備された複数種類のプライマーセットをそれぞれに用いて、設定された共通の温度サイクル条件下で増幅反応を行う工程とを備える。また、高感度の検出を目的とする場合には、ネステッドP C R法を用いる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 所定の分類範囲において特異的かつ普遍的な塩基配列を持つ微生物の遺伝子を標的とするプライマーを用いて、前記分類範囲に属する前記微生物の前記遺伝子をPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法の増幅反応における温度サイクル条件を予め一定条件に設定するとともに、その設定条件下で、標的とされる前記遺伝子が増幅されるように設計されたプライマーセットを、検出対象とする複数種類の前記微生物のそれぞれについて調整する工程と、

検出対象とされる前記微生物のうち少なくとも一つを含む試料について、調整された前記プライマーセットをそれぞれ用いて、設定された前記温度サイクル条件に基づいて増幅反応を行なう工程とを備え、

下記の（A）～（HH）からなるイ群、及び（a）～（hh）からなるロ群より選択される複数種類の前記プライマーセットを用いた微生物の検出方法。

イ群：

（A）エロモナス・ヒドロフィラ（*Aeromonas hydrophila*）を検出するための配列番号1及び配列番号2に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（B）エロモナス（*Aeromonas*）属を検出するための配列番号3及び配列番号4に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（C）バシラス・セレウス（*Bacillus cereus* group）群を検出するための配列番号5及び配列番号6に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（D）バクテロイデス・フラジリス（*Bacteroides fragilis*）を検出するための配列番号7及び配列番号8に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（E）カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）を検出するための配列番号9及び配列番号10に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（F）カンピロバクター・ジェジュニ／コリ（*Campylobacter jejuni/coli*）を検出するための配列番号11及び配列番号12に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（G）カンピロバクター（*Campylobacter*）属を検出するための配列番号13及び配列番号14に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（H）クロストリジウム・ボツリナム（*Clostridium botulinum*）を検出するための配列番号15乃至配列番号34に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（I）クロストリジウム・ブチリカム（*Clostridium butyricum*）を検出するための配列番号35及び配列番号36に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（J）クロストリジウム・ディフィシレ（*Clostridium difficile*）を検出するための配列番号37乃至配列番号42に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセッ

ト、

（K）クロストリジウム・パーフリンジェンス（*Clostridium perfringens*）を検出するための配列番号43乃至配列番号46に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（L）クリプトスポリジウム・パルブム（*Cryptosporidium parvum*）を検出するための配列番号47及び配列番号48に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（M）エントアメーバ・ヒストリティカ（*Entamoeba histolytica*）を検出するための配列番号49及び配列番号50に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（N）腸管凝集付着性大腸菌（*Escherichia coli* (EaggEC)）を検出するための配列番号51乃至配列番号54に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（O）腸管組織侵入性大腸菌（*Escherichia coli* (EIEC)）を検出するための配列番号55及び配列番号56に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（P）腸管出血性大腸菌（*Escherichia coli* (EHEC)）を検出するための配列番号57乃至配列番号60に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（Q）毒素原性大腸菌（*Escherichia coli* (ETEC)）を検出するための配列番号61乃至配列番号66に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（R）大腸菌（*Escherichia coli*）の病原因子の一つであるインティミン（intimin（接着因子））産生遺伝子（*eaeA*）を検出するための配列番号67及び配列番号68に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（S）ギアルディア・ランブリア（*Giardia lamblia*）を検出するための配列番号69及び配列番号70に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（T）リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）を検出するための配列番号71乃至配列番号74に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（U）プレジオモナス・シゲロイデス（*Plesiomonas shigelloides*）を検出するための配列番号75及び配列番号76に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（V）サルモネラ（*Salmonella*）属を検出するための配列番号77乃至配列番号80に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（W）サルモネラ・タイフィ（*Salmonella typhi*）を検出するための配列番号81及び配列番号82に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（X）シゲラ・フレクスネリ（*Shigella flexneri*）を検出するための配列番号83及び配列番号84に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

（Y）スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus*

us aureus) を検出するための配列番号 85 乃至配列番号 94 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(Z) トロフェリマ・ウィッペリ (*Tropheryma whippellii* (Whipple Disease)) を検出するための配列番号 95 乃至配列番号 98 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(AA) ビブリオ・コレラ (*Vibrio cholerae*) を検出するための配列番号 99 及び配列番号 100 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(BB) ビブリオ・コレラ／ミミカス (*Vibrio cholerae/mimicus*) を検出するための配列番号 101 及び配列番号 102 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(CC) ビブリオ・フルビアリス (*Vibrio fluvialis*) を検出するための配列番号 103 及び配列番号 104 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(DD) ビブリオ・パラヘモリティカス (*Vibrio parahemolyticus* group) 群を検出するための配列番号 105 及び配列番号 106 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(EE) ビブリオ・パラヘモリティカス (*Vibrio parahemolyticus*) を検出するための配列番号 107 及び配列番号 108 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(FF) ビブリオ (*Vibrio*) 属を検出するための配列番号 109 及び配列番号 110 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(GG) エルシニア・エンテロコリティカ (*Yersinia enterocolitica*) を検出するための配列番号 111 及び配列番号 112 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(HH) エルシニア・エンテロコリティカ (*Yersinia enterocolitica* group) 群を検出するための配列番号 113 及び配列番号 114 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット。

口群：

(a) エロモナス・ヒドロフィラを検出するための配列番号 115 及び配列番号 116 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(b) エロモナス属を検出するための配列番号 117 及び配列番号 118 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(c) バシラス・セレウスを検出するための配列番号 119 及び配列番号 120 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(d) バクテロイデス・フラジリスを検出するための配列番号 121 及び配列番号 122 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(e) カンピロバクター・ジェジュニを検出するための

配列番号 123 及び配列番号 124 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(f) カンピロバクター・ジェジュニ／コリを検出するための配列番号 125 及び配列番号 126 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(g) カンピロバクター属を検出するための配列番号 127 及び配列番号 128 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(h) クロストリジウム・ボツリナムを検出するための配列番号 129 乃至配列番号 148 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(i) クロストリジウム・ブチリカムを検出するための配列番号 149 及び配列番号 150 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(j) クロストリジウム・ディフィシレを検出するための配列番号 151 乃至配列番号 156 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(k) クロストリジウム・パーフリンジェンスを検出するための配列番号 157 乃至配列番号 160 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(l) クリプトスポリジウム・パルブムを検出するための配列番号 161 及び配列番号 162 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(m) エントアメーバ・ヒストリティカを検出するための配列番号 163 及び配列番号 164 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(n) 腸管凝集付着性大腸菌を検出するための配列番号 165 乃至配列番号 168 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(o) 腸管組織侵入性大腸菌を検出するための配列番号 169 及び配列番号 170 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(p) 腸管出血性大腸菌を検出するための配列番号 171 乃至配列番号 174 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(q) 毒素原性大腸菌を検出するための配列番号 175 乃至配列番号 180 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(r) 大腸菌の病原因子の一つであるインティミン産生遺伝子を検出するための配列番号 181 及び配列番号 182 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(s) ギアルディア・ランブリアを検出するための配列番号 183 及び配列番号 184 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(t) リステリア・モノサイトゲネスを検出するための配列番号 185 乃至配列番号 188 に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(u) プレジオモナス・シゲロイデスを検出するための配列番号 189 及び配列番号 190 に示す塩基配列をそ

れぞれに持つプライマーセット、

(v) サルモネラ属を検出するための配列番号191乃至配列番号194に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(w) サルモネラ・タイフィを検出するための配列番号195及び配列番号196に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(x) シゲラ・フレクスネリを検出するための配列番号197及び配列番号198に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(y) スタフィロコッカス・アウレウスを検出するための配列番号199乃至配列番号208に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(z) トロフェリマ・ウィッペリを検出するための配列番号209乃至配列番号212に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(aa) ビブリオ・コレラを検出するための配列番号213及び配列番号214に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(bb) ビブリオ・コレラ／ミミカスを検出するための配列番号215及び配列番号216に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(cc) ビブリオ・フルビアリスを検出するための配列番号217及び配列番号218に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(dd) ビブリオ・バラヘモリティカスを検出するための配列番号219及び配列番号220に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(ee) ビブリオ・バラヘモリティカス群を検出するための配列番号221及び配列番号222に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(ff) ビブリオ属を検出するための配列番号223及び配列番号224に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(gg) エルシニア・エンテロコリチカを検出するための配列番号225及び配列番号226に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット、

(hh) エルシニア・エンテロコリチカ群を検出するための配列番号227及び配列番号228に示す塩基配列をそれぞれに持つプライマーセット。

【請求項2】 前記イ群より選択されるプライマーセットとともに、前記ロ群より選択されるプライマーセットをネステッドプライマーとして用いることを特徴とする請求項1に記載の微生物の検出方法。

【請求項3】 請求項1に記載の各群より選択される複数種類のプライマーセットで構成されることを特徴とする微生物の検出用プライマーセット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、微生物の遺伝子を

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法で増幅して検出する微生物の検出方法、及び微生物の検出用プライマーセットに関するものであり、特に、人体に食中毒などを引き起こす原因菌となる微生物の遺伝子を対象として共通の条件で増幅させる微生物の検出方法、及び微生物の検出用プライマーセットに関するものである。

【0002】

【従来の技術】 一般に、細菌などの微生物を検出し同定するためには、選択培地による分離培養、顕微鏡による形態観察、あるいは培養菌を用いた生理学的性状や薬剤感受性などの試験が行われる。しかし、培養を前提とするこれらの手法は、培養が困難なレジオネラなどの場合には適用することが困難である。また、培養時間が必須であり、その他にも時間のかかる操作が含まれることから、結果が得られるまでには通常数日間を要し、培養期間が長い結核菌などの場合は数週間という期間が必要となる。このような時間的な制約は、赤痢や敗血症などの急性感染症を引き起こす病原体や薬剤耐性菌など、迅速な同定が求められる場合においては、大きな障害となっている。

【0003】 そこで、近年では、遺伝子を分析することによって微生物を検出し同定する遺伝子検査法が、臨床検査の現場などに広く導入されつつある。この遺伝子検査法では、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を組み合わせることで微生物の遺伝子を増幅させることにより、検出感度を飛躍的に向上させることができる。しかも、培養期間を待つ必要がないため短時間で結果を得ることができる。PCR法では、プライマーと呼ばれる一対のDNA断片を必要とし、増幅したい遺伝子領域の5'末端部分に相当する塩基配列（センス側）と、3'末端部分に相当する相補的な塩基配列（アンチセンス側）とを用いる。したがって、ある微生物に特異的な遺伝子を標的とするプライマーを用いて増幅すれば、その微生物を同定することも可能である。

【0004】 PCR法の増幅反応は、DNAの熱変性、プライマーのアニーリング、及びポリメラーゼ伸長反応のそれぞれの温度条件で反応液をインキュベートすることによって進行し、この三つのステップからなる温度サイクルを繰り返すことで所望の増幅産物が得られる。増幅反応の至適条件は使用するプライマーの種類によって異なり、中でも温度サイクルのアニーリング条件はプライマーの塩基配列や鎖長に大きく影響される。したがって、PCR法により高感度で目的とする増幅産物を得るには、プライマーの至適条件を予備実験などによって確認し、その条件に基づいて増幅反応を行うことが重要とされる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、微生物の検出試験は、特定の微生物の検出を目的とする以外に、不

特定の微生物の検出、あるいは複数種類の微生物の同時検出を目的として行われることが多い。このような試験においてPCR法を適用する場合には、広範囲の微生物の間、例えば細菌全般に普遍的な遺伝子を標的とするプライマー（ユニバーサルプライマー）や、検出対象とする各微生物に特異的な遺伝子を標的とする複数種類のプライマーが用いられる。しかし、ユニバーサルプライマーを用いる方法は、増幅反応の段階で微生物を特定することができないため、同定のための後操作が必要となる。一方、複数種類のプライマーを用いる方法は、増幅反応の段階である程度の種の特定が可能であるが、各プライマーについて温度サイクル条件を設定する必要が生じる。

【0006】PCR法における温度サイクルの制御は、一般に、反応液を入れた容器をPCR装置（サーマルサイクラー）を用いて加熱又は冷却し、反応液の温度を設定された温度サイクル条件に基づき変動させることにより行われる。ところが、PCR装置では基本的に一種類の温度サイクル条件しか制御することができないため、異なる温度サイクル条件を設定しようとする場合には、それぞれの増幅反応を順次行う必要があった。このため、複数種類のプライマーセットを用いる場合には、たとえ試料が一種類のみであっても、それぞれの増幅反応を同時に行うことが困難であり、迅速性というPCR法による利益を十分に享受することができなかった。また、プライマー毎に異なる温度サイクル条件を適用する必要があることから、その操作が煩雑であり、温度サイクル条件の設定ミスなどの誤操作を誘発する要因にもなっていた。

【0007】近年に入り、病原性大腸菌O-157などによる微生物に起因する大規模な食中毒事件が発生している。このような場合、対象となる微生物種を特定し、さらに該微生物種に対応した適切な治療及び処置を迅速

に行なう必要があった。また、大腸菌以外にも、ボツリヌス菌やサルモネラ菌などの微生物によって激痛を伴う下痢症状を引き起こすことがあった。そのため、特に、これらの微生物の検出を速やかに行なえるPCR法に基づいた微生物の検出方法、及び該PCR法に用いるプライマーセットが求められていた。

【0008】そこで、本発明は、上記実情に鑑み、複数種類の微生物を検出対象とし、特に人体に対し、下痢症状を含む食中毒の原因菌となる各微生物の遺伝子を共通の条件で増幅させて検出することができる微生物の検出方法、及びその方法に用いられるプライマーセットの提供を課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】請求項1に記載の発明に係る微生物の検出方法は、所定の分類範囲において特異的かつ普遍的な塩基配列を持つ微生物の遺伝子を標的とするプライマーを用いて、前記分類範囲に属する前記微生物の前記遺伝子をPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法の増幅反応における温度サイクル条件を予め一定条件に設定するとともに、その設定条件下で、標的とされる前記遺伝子が増幅されるように設計されたプライマーセットを、検出対象とする複数種類の前記微生物のそれぞれについて調整する工程と、検出対象とされる前記微生物のうち少なくとも一つを含む試料について、調整された前記プライマーセットをそれぞれ用いて、設定された前記温度サイクル条件に基づいて増幅反応を行なう工程とを備え、下記の表1及び表2の（A）～（HH）からなるイ群、及び表3及び表4の（a）～（hh）からなるロ群より選択される複数種類のプライマーセットを用いたものである。

【0010】

【表1】

プライマーセット(外側-1)

| 対象微生物 |                                  | 塩基配列(5'-3')                     |                                      |
|-------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
|       |                                  | センスプライマー                        | アンチセンスプライマー                          |
| (A)   | <i>Aeromonas hydrophila</i>      | 配列番号1:<br>GGGCTGACAGCGAAGTG     | 配列番号2:<br>TGACTGTGTCATCGTGC          |
| (B)   | <i>Aeromonas spp.</i>            | 配列番号3:<br>GGGAAAGTACCTTGGTAC    | 配列番号4:<br>CTTTCTCTCGCTGAAA           |
| (C)   | <i>Bacillus cereus group</i>     | 配列番号5:<br>CAAAATCTATGAATGCCCT   | 配列番号6:<br>CTCTTAATTAGTTAATTCTTC      |
| (D)   | <i>Bacteroides fragilis</i>      | 配列番号7:<br>CGAAGACGGTGTATGTGATT  | 配列番号8:<br>CGCCAGTATATGACCTAGT        |
| (E)   | <i>Campylobacter jejuni</i>      | 配列番号9:<br>CATGTACACTAGTTGTGGG   | 配列番号10:<br>AAGCTAGCAGCCTCATAT        |
| (F)   | <i>Campylobacter jejuni/coli</i> | 配列番号11:<br>ACGATGAAGCTTCTAGCT   | 配列番号12:<br>AGTTTAATGGTTAAGCCA        |
| (G)   | <i>Campylobacter spp.</i>        | 配列番号13:<br>GTATAGTTAATGTGCCCTAC | 配列番号14:<br>TATTCCTTAGGTACCGTCA       |
| (H)   | <i>Clostridium botulinum</i>     | 配列番号15:<br>AGTTAGAGCTAGAAAACCTG | 配列番号16:<br>ACTTGAATTAAAGAATTGA       |
|       |                                  | 配列番号17:<br>CTGTAGGCTAATACAGATT  | 配列番号18:<br>AATAGTAACTAGGCTTTTT       |
|       |                                  | 配列番号19:<br>TTCAGATCTGTTGATAATA  | 配列番号20:<br>TCAGAACTATTATGGAGT        |
|       |                                  | 配列番号21:<br>GGTATTATTGTAAATGAT   | 配列番号22:<br>GGTTTTAAGCAATCTCTGA       |
|       |                                  | 配列番号23:<br>TCCTTAATTCTACAGCAAT  | 配列番号24:<br>TTATTAAGCATTTAGTAGC       |
|       |                                  | 配列番号25:<br>TTATAATGATCTGTTAATG  | 配列番号26:<br>ATCTGGAGTATTATCATCC       |
|       |                                  | 配列番号27:<br>CTGTACTTGAACAAGCTGA  | 配列番号28:<br>GTGTAGTTGAAAACGATT        |
|       |                                  | 配列番号29:<br>GCTAGAAAACGTATACGGT  | 配列番号30:<br>TTTTTATTAGATTTGGTG        |
|       |                                  | 配列番号31:<br>CGGGCTAGAAAACATAAC   | 配列番号32:<br>TTTTTATTAGATTTGGTG        |
|       |                                  | 配列番号33:<br>CTTTTATGGAACAATGTATT | 配列番号34:<br>ATAAATTTCACACCAAT         |
|       |                                  | 配列番号35:<br>GTTGTCAAGATTITATAAA  | 配列番号36:<br>AATAGTATGCTTGGCTACC       |
|       |                                  | 配列番号37:<br>CTCTTCAAGTCAGGAGT    | 配列番号38:<br>ACCTTGGAGCGTACTT          |
|       |                                  | 配列番号39:<br>AGAAGAGTTAATAAACTGG  | 配列番号40:<br>TGACTATCATCCAGATT         |
|       |                                  | 配列番号41:<br>GTCAGAGAACTGTAGTGG   | 配列番号42:<br>TTCTGATCTCTACAGTT         |
|       |                                  | 配列番号43:<br>TAACACGTGGGTAACTG    | 配列番号44:<br>TCCTGGGTACCGTCAIT         |
|       |                                  | 配列番号45:<br>TTTAAGTGTGGATTATATG  | 配列番号46:<br>TCAGAGATATTACCATGAGA      |
|       |                                  | 配列番号47:<br>CTCTGTACAGCTGCTATC   | 配列番号48:<br>CAACAGCAGACATCAAG         |
|       |                                  | 配列番号49:<br>TCAAGAGAAAGATGTTGTA  | 配列番号50:<br>GCTACTCCGCTTTACTTTT       |
|       |                                  | 配列番号51:<br>CTGGCGAAAGACTGTATCAT | 配列番号52:<br>CAATGTATAGAAATCGGCTGTT    |
|       |                                  | 配列番号53:<br>GAACGATATCTCATCGGCT  | 配列番号54:<br>ATCGCTTTCAGGTCCGAGTGACGGC |
| (I)   | <i>Escherichia coli (EIEC)</i>   | 配列番号55:<br>TATATCTACTCTTGATGCCA | 配列番号56:<br>TTTTATTCTCTCTTAATA        |
| (P)   | <i>Escherichia coli (EHEC)</i>   | 配列番号57:<br>TGTGAGGGGATAGATCC    | 配列番号58:<br>AAATCCCTCTGTATTG          |
|       |                                  | 配列番号59:<br>TGGAGTTCAGTGGTAATACA | 配列番号60:<br>TGTAATACITTCCTATAATG      |

【0011】

【表2】

プライマーセット(外側-2)

|      | 対象微生物   | 塩基配列 (5' - 3')  |   |
|------|---|---|---|
|      |   | センスプライマー  | アンチセンスプライマー   |
| (Q)  | <i>Escherichia coli</i> (EPEC)                | 配列番号61:<br>CAGATATATGGATGGTATCG<br>配列番号63:<br>TCTGTATGTCTTTTCACC<br>配列番号65:<br>CCGAGGTAATATGAGA   | 配列番号62:<br>CTGCTCTTAACCTTTGATT<br>配列番号64:<br>AGCAGGATTACAACACAATT<br>配列番号66:<br>ATTATTCACCAAGCAACA  |
| (R)  | <i>Escherichia coli</i>                       | 配列番号67:<br>AAGATTGATTATGCTTAGTG   | 配列番号68:<br>TASTCAGTTATTCGTGGA   |
| (S)  | <i>Giardia lamblia</i> group                  | 配列番号69:<br>GAGGCTCTCCCAAGGA   | 配列番号70:<br>GAATTACGCGGCTGCTG  |
| (T)  | <i>Listeria monocytogenes</i>                 | 配列番号71:<br>ATCGATAAGTATATACAAGG<br>配列番号73:<br>TACCAATAGCACACAAA   | 配列番号72:<br>ATTCCATCTTCGACTAATG<br>配列番号74:<br>CTGGATATGTTAGGCTCG   |
| (U)  | <i>Plesiomonas shigelloides</i>               | 配列番号75:<br>TACACAGAGGAGGCTTGC   | 配列番号76:<br>ATGCCACTAGGTATTAACT  |
| (V)  | <i>Salmonella</i> spp.                        | 配列番号77:<br>GCCATGCTGTTGATGATAT<br>配列番号79:<br>TTCTACATTGACAGAATCCT   | 配列番号78:<br>TTACTCACTCCCTGAATCTG<br>配列番号80:<br>TCACCTTTGATAAAGTCAT   |
| (W)  | <i>Salmonella typhi</i>                       | 配列番号81:<br>ATTAGTTTATTTGAGCATAA   | 配列番号82:<br>TTTACTATATGCTTACGGTT   |
| (O)  | <i>Shigella flexneri</i>                      | 配列番号83:<br>TAATGGAGAAATTATTICA  | 配列番号84:<br>ATGGTCATATTGCTACCAAT   |
| (Y)  | <i>Staphylococcus aureus</i>                  | 配列番号85:<br>GCAATCTTAACAAATCTAT<br>配列番号87:<br>GAAAATATGAAAGTTTGTG<br>配列番号89:<br>GATGATCATATGATACAGC<br>配列番号91:<br>ATTTAACATCTTATGTCAT<br>配列番号93:<br>ATCTTAGGCAAAATTATTAT | 配列番号86:<br>TATTTTCTGTAAATAACG<br>配列番号88:<br>AATAAATTTTACCATCTG<br>配列番号90:<br>GTCTTGAGCTGTACACIT<br>配列番号92:<br>ATCTTATAGGGTAAACATCT<br>配列番号94:<br>TTATATAAACCAAAATTTCC |
| (Z)  | <i>Tropheryma whippelii</i> (Whipple Disease) | 配列番号95:<br>TTGCTCCCTGTGATTAGT<br>配列番号97:<br>CCCTAAGCTTGGGATAAC  | 配列番号96:<br>GCCAAAGAGGTTTACAA<br>配列番号98:<br>TTCTGCAAGTACCGTCA  |
| (AA) | <i>Vibrio cholerae</i>                        | 配列番号99:<br>GAGGTACTCAATGAATATC  | 配列番号100:<br>ATTACTCATGATGATCTTG   |
| (BB) | <i>Vibrio cholerae/mimicus</i>                | 配列番号101:<br>TAACCATTTGGAAACGATG   | 配列番号102:<br>AATGATTAGGGTATTAACTT  |
| (CC) | <i>Vibrio fluvialis</i>                       | 配列番号103:<br>CAGCGACAACTTGAACCTT   | 配列番号104:<br>AGCTAACGTCAAAAGATA  |
| (DD) | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                | 配列番号105:<br>GGAAACGAGTTATCTGAA  | 配列番号106:<br>GTCAAATGATGGTGTAT   |
| (EE) | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> group          | 配列番号107:<br>GTTCTGATGAGATATTGTTT  | 配列番号108:<br>AAAATATTCTGGAGTTTCAT  |
| (FF) | <i>Vibrio</i> spp.                            | 配列番号109:<br>TAACCATTTGGAAACGATG   | 配列番号110:<br>CTTAACAACCACTTCCA   |
| (GG) | <i>Yersinia enterocolitica</i>                | 配列番号111:<br>GTGAGTAATGCTGGGAACT   | 配列番号112:<br>GTAACGTCAATCCAACAA  |
| (HH) | <i>Yersinia enterocolitica</i> group          | 配列番号113:<br>ATACCGCATAACGTCTTC  | 配列番号114:<br>TAAGTCAATCCAACAC  |

【0012】

【表3】



プライマーセット(内側-1)

| 対象微生物 |                                  | 塩基配列 (5' - 3')                       |                                      |
|-------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|       |                                  | センスプライマー                             | アンチセンスプライマー                          |
| (a)   | <i>Aeromonas hydrophila</i>      | 配列番号 115 :<br>TGCTGGCGACGCTGATTG     | 配列番号 116 :<br>TCCTGGCTGGCTGGCATGC    |
| (b)   | <i>Aeromonas</i> spp.            | 配列番号 117 :<br>ATATCAGTTGGAAACGACTG   | 配列番号 118 :<br>GGCTGCATCAGGGTTTCC     |
| (c)   | <i>Bacillus cereus</i> group     | 配列番号 119 :<br>CTGTACTTGGGATACGAAAGT  | 配列番号 120 :<br>TCTATTAGTTGTTGTGCATACT |
| (d)   | <i>Bacteroides fragilis</i>      | 配列番号 121 :<br>CGAAGTCGGTTTATGCAATT   | 配列番号 122 :<br>CCGAGCCGTTATTCACATTA   |
| (e)   | <i>Campylobacter jejuni</i>      | 配列番号 123 :<br>CATCTCAGTAATGCACTAACG  | 配列番号 124 :<br>GCACCTGCATATCTGTATAAGG |
| (f)   | <i>Campylobacter jejuni/coli</i> | 配列番号 125 :<br>CCTGCTTAACGACAGTTGAG   | 配列番号 126 :<br>CCTCAGATTTCTTCCCTAAG   |
| (g)   | <i>Campylobacter</i> spp.        | 配列番号 127 :<br>CGGTGTAGGATGAGACTATA   | 配列番号 128 :<br>CCAGTGTGACTGATGATCCCT  |
| (h)   | <i>Clostridium botulinum</i>     | 配列番号 129 :<br>GCCAGAGAGATATTATGGGG   | 配列番号 130 :<br>TTCCCGAGCTTAGTACTAT    |
|       |                                  | 配列番号 131 :<br>ATCAAGTTCCCGGTAAACGGT  | 配列番号 132 :<br>TTGATCTCTTGAGCGCTGAT   |
|       |                                  | 配列番号 133 :<br>CACTAGCTAATGAGCGTGAA   | 配列番号 134 :<br>GGGTATATCTGTGCGAAGTC   |
|       |                                  | 配列番号 135 :<br>AAGTCGCAAGATGGATTGG    | 配列番号 136 :<br>CCCAGTAAAGCTTAATTCCCT  |
|       |                                  | 配列番号 137 :<br>CAAGTACATTCCTATTTCCT   | 配列番号 138 :<br>ACCATTCTCAGCATCATCT    |
|       |                                  | 配列番号 139 :<br>GATTTTCATCCGCTACTTC    | 配列番号 140 :<br>TCCTTCCTGAAAGATTATTA   |
|       |                                  | 配列番号 141 :<br>CTCTACTAACCGCAACCGAT   | 配列番号 142 :<br>ACGGATGCGAGTCGATGATAG  |
|       |                                  | 配列番号 143 :<br>CTAATTTCTTTTCAAGATAGTG | 配列番号 144 :<br>TATATCCATAAGGAAATGGAAT |
|       |                                  | 配列番号 145 :<br>CTAATTTCTTTTCAAGATAGTG | 配列番号 146 :<br>TATATCCATAAGGAAATGGAAT |
|       |                                  | 配列番号 147 :<br>GATTATGCAAAATAGTTTAG   | 配列番号 148 :<br>TTTCTCAACCAAAATAAATTG  |
| (i)   | <i>Clostridium butyricum</i>     | 配列番号 149 :<br>CAAGATTCTTCACCGCTAC    | 配列番号 150 :<br>GCATCACCATATGGAATTG    |
| (j)   | <i>Clostridium difficile</i>     | 配列番号 151 :<br>CTCTTGAAGTGGGAGACTTGA  | 配列番号 152 :<br>TAACCCCGAACACCTAG      |
|       |                                  | 配列番号 153 :<br>CTTCAAGCAGAAATAGAGCA   | 配列番号 154 :<br>GGCCATTGTTTTATGTATTC   |
|       |                                  | 配列番号 155 :<br>TCTGTAGAAATAAGGCTT     | 配列番号 156 :<br>GTCTTATCAAAATGCAAT     |
| (k)   | <i>Clostridium perfringens</i>   | 配列番号 157 :<br>CGCATAAATGTTGAAGATGGC  | 配列番号 158 :<br>ACGCATCTGCTCTTGGT      |
|       |                                  | 配列番号 159 :<br>GGAGATGTTTGGATATTAGG   | 配列番号 160 :<br>GGACCGACAGTTGTAGATAC   |
| (l)   | <i>Cryptosporidium parvum</i>    | 配列番号 161 :<br>ATGGTCAGCAATCTTTTCC    | 配列番号 162 :<br>CGGAGGAGATGTTATCCCT    |
| (m)   | <i>Entamoeba histolytica</i>     | 配列番号 163 :<br>GCACAAATTGAAAGAGAGC    | 配列番号 164 :<br>TCACACCATGCTTGTGAGA    |
| (n)   | <i>Escherichia coli</i> (EaggEC) | 配列番号 165 :<br>TAGGGTTAGGGCAGTATATA   | 配列番号 166 :<br>CTCTCGAGCATCAACATCAG   |
|       |                                  | 配列番号 167 :<br>TGCCATCAACACAGTATATCC  | 配列番号 168 :<br>AGTCTTTCATGACACGAG     |
| (o)   | <i>Escherichia coli</i> (EIEC)   | 配列番号 169 :<br>CAAAAGAGCATAGCATCCGA   | 配列番号 170 :<br>GGCGATTGGAAATAGAGATA   |
| (p)   | <i>Escherichia coli</i> (EHEC)   | 配列番号 171 :<br>CTACGGCTTATTTTGAACG    | 配列番号 172 :<br>GAGGTTCCACTATGCGACAT   |
|       |                                  | 配列番号 173 :<br>CACCTGTCAGCAGAGCCCT    | 配列番号 174 :<br>GCCAGTTATCTGACATTCTG   |

【0013】

【表4】

プライマーセット(内報-2)

|      | 対象微生物                                | 塩基配列 (5' - 3')                      |  |
|------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
|      |                                      | センスプライマー                            | アンチセンスプライマー                            |
| (a)  | <i>Escherichia coli</i> (ETEC)       | 配列番号 175 :<br>CAGGGAATATAGAGACGGGT  | 配列番号 176 :<br>GTGCTCAGATTCTGGGTCTC     |
|      |                                      | 配列番号 177 :<br>CGCTCAGGATGCTAAACGAG  | 配列番号 178 :<br>ATTTCAGCTTTTACGACAC      |
|      |                                      | 配列番号 179 :<br>CTGTATGTCCTTTTCACCTT  | 配列番号 180 :<br>AGACATCATCAGATCAGAAC     |
|      |                                      | 配列番号 181 :<br>TGATAGCTATCAGAAATGGC  | 配列番号 182 :<br>CAAGAGGTGCGAACCTAAA      |
| (r)  | <i>Escherichia coli</i>              | 配列番号 183 :<br>CCCTCTAGCGGACACCC     | 配列番号 184 :<br>ATGTCCGGCCGCTCTCTC       |
| (a)  | <i>Giardia lamblia</i> group         | 配列番号 185 :<br>ATACACGGAGATGCAGTGA   | 配列番号 186 :<br>CTTGATTAGTCATTCCTGGC     |
| (c)  | <i>Listeria monocytogenes</i>        | 配列番号 187 :<br>CATCCATGGCACCACCAA    | 配列番号 188 :<br>CGGCACATTGTCACCTGC       |
| (u)  | <i>Plesiomonas shigelloides</i>      | 配列番号 189 :<br>GATAAGTACGGAACTGTAGC  | 配列番号 190 :<br>CCAGTGTGACTGGTCTTCT      |
| (v)  | <i>Salmonella</i> spp.               | 配列番号 191 :<br>AAATCCCTCCAGCTGATCC   | 配列番号 192 :<br>GCCAATGAGACGCTTAAGCG     |
|      |                                      | 配列番号 193 :<br>TTGAGCCGATCCCGGTGAA   | 配列番号 194 :<br>GCCGAGCATCCGATCAATA      |
|      |                                      | 配列番号 195 :<br>TCATCATTTCTGGCCTCCGA  | 配列番号 196 :<br>CGCATCGAAACAGGAATAA      |
| (c)  | <i>Shigella flexneri</i>             | 配列番号 197 :<br>CAAGCAAGGACTATTCCG    | 配列番号 198 :<br>AGCCATCATACCAATACCG      |
| (y)  | <i>Staphylococcus aureus</i>         | 配列番号 199 :<br>TTTTACAGATCATTCGTGGT  | 配列番号 200 :<br>TGATCGGCATTTTTCTCT       |
|      |                                      | 配列番号 201 :<br>TATGATAATTTTCAGTCGA   | 配列番号 202 :<br>CGCGACAGTAATATCTTA       |
|      |                                      | 配列番号 203 :<br>TGATAGATAATTTTGGCAG   | 配列番号 204 :<br>CAAAGTGGTTTCTTCATGT      |
|      |                                      | 配列番号 205 :<br>CTCCCTTAAACGTTAAAGCC  | 配列番号 206 :<br>CCATTTCCTTTGAATTGAAG     |
|      |                                      | 配列番号 207 :<br>TTTTACAGGTCATCCATGG   | 配列番号 208 :<br>CGGTCAATCGGTTATTATCA     |
|      |                                      | 配列番号 209 :<br>CCTAAGCTTTGGGATAACTTC | 配列番号 210 :<br>GGCTACCCATGATGGCTT       |
|      |                                      | 配列番号 211 :<br>ATACCAATACGACCCATGA   | 配列番号 212 :<br>GTACCGTCACTTCTCTCT       |
|      |                                      | 配列番号 213 :<br>TGCAAGAGGAAGTCAGACGG  | 配列番号 214 :<br>CCACCTTAAGCAGAAACTT      |
|      |                                      | 配列番号 215 :<br>TAATACCGCATACCTCGCA   | 配列番号 216 :<br>CTTGCATCAGCTTGGCG        |
|      |                                      | 配列番号 217 :<br>ATGCTTGGGAAATTGCGCTG  | 配列番号 218 :<br>GATACCTCTCTGCTACCTGC     |
| (dd) | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>       | 配列番号 219 :<br>TGATAGCTTGGCTTAAAGA   | 配列番号 220 :<br>CCAGCTTCTGACGGCTG        |
| (ee) | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> group | 配列番号 221 :<br>CCGGTCAATGTAAGGTCTC   | 配列番号 222 :<br>GCTACAGAAATTATAGGAATGTTG |
| (ff) | <i>Vibrio</i> spp.                   | 配列番号 223 :<br>AACGATGGCTAATACCGC    | 配列番号 224 :<br>CATCAGGCTTGGGCGCAT       |
| (gg) | <i>Yersinia enterocolitica</i>       | 配列番号 225 :<br>TACCGCTAAGCTCTTCG     | 配列番号 226 :<br>GTTATTTGGCTTCTCTCT       |
| (hh) | <i>Yersinia enterocolitica</i> group | 配列番号 227 :<br>ATAAGCTCTTGGACCAA     | 配列番号 228 :<br>AACGTATTAGTTATTGGCC      |

【0014】ここで「微生物」とは顕微鏡的な大きさの生物を意味し、細菌や菌類、原生動物、ウイルスなどを含む。また「分類範囲」とは、ある特定の種類に分類される微生物の集まりをいい、例えば、下位の種 (species) から属 (genus)、科 (family) などの上位に向かう階層的な微生物の分類体系における、種としての大腸菌、属としてのエロモナス属、あるいはより上位の階層での菌類、などを挙げることができる。また、各表中の "spp" は、その属に属するすべての種を示し、"group" は、その種に属する株の集まりを示している。

【0015】したがって、請求項1の発明の微生物の検出方法によれば、ある微生物に特異的な遺伝子を標的とするプライマーを用いてPCR法を行い、目的とする増幅産物の生成を確認することにより、その試料中に当該微生物が含まれるか否かを判定する。これは、何らかの微生物が混入している試料には、必然的に当該微生物に由来する遺伝子DNAが含まれるという原理に基づいている。ここで、PCR法では、複数種類のプライマーセットを用いてそれぞれに増幅反応を行う。各プライマーセットは、予め設定された一定の温度サイクル条件下において、増幅反応が好適に進行するように設計されたものであり、特にアニーリングの温度条件が共通するよう

にその塩基配列や鎖長が設計されている。これによって、広範囲の微生物を検出対象としながら、増幅条件における温度サイクル条件を共通化できる微生物の検出系が構築される。

【0016】そこで、表1乃至表4に示すように、特に人体に対し、下痢症状を引き起こす要因となるものを検出対象とし、これらの対象微生物の検出を目的とする複数種類のプライマーセットが用意される。これらのプライマーセットを組み合わせることで、広範囲の微生物が検出対象として網羅される。これらのプライマーセットはまた、一定の温度サイクル条件において標的とする遺伝子を増幅させるように設計されている。具体的には、表1及び表2に示すI群の各プライマーは45～55℃の温度範囲において、表3及び表4に示すII群の各プライマーは55～65℃の温度範囲において、それぞれに標的とする微生物の遺伝子に好適にアニーリングするように、その塩基配列や鎖長が設計されている。なお、同一の対象微生物でも、プライマーセットの標的となる対象遺伝子が異なる場合には、それぞれの対象遺伝子に対応したプライマーセットが個々に設計されている(例えば、*Clostridium botulinum*など)。

【0017】請求項2の発明にかかる微生物の検出方法

は、請求項1に記載の微生物の検出方法において、前記イ群より選択されるプライマーセットとともに、前記ロ群より選択されるプライマーセットをネステッドプライマーとして用いるものである。

【0018】ここで、ネステッドプライマーとは、ネステッドPCR (Nested-PCR) 法において用いられるものであり、第一段階の増幅産物を鋳型とし、その最初に用いたプライマーより内側に設定した別のプライマーに相当するものである。そして、このネステッドプライマーを用いて第二段階の増幅反応を行なうものであり、ネステッドプライマーは、二段階PCR法とも呼ばれている。

【0019】したがって、請求項2の微生物の検出方法によれば、請求項1の微生物の検出方法の作用に加え、表1及び表2に示すプライマーセットと表3及び表4に示すプライマーセットをネステッドプライマーとして併用してネステッドPCR法を行うことにより、検出の感度や特異性がより一層向上する。

【0020】請求項3にかかる微生物の検出用プライマーセットは、請求項1に記載の各群より選択される複数種類のプライマーセットで構成されるものである。

【0021】したがって、請求項3の微生物の検出用プライマーセットは、複数種類の病原性微生物を検出対象とするプライマーセットとして機能する。すなわち、これらのプライマーセットを用いることにより、請求項1に記載の発明の作用を奏する。

【0022】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の微生物の検出方法は、所定の分類範囲において特異的かつ普遍的な塩基配列を持つ微生物の遺伝子を標的とするプライマーを用いて、前記分類範囲に属する前記微生物の前記遺伝子をPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法により増幅して検出するものである。さらには、PCR法の増幅反応における温度サイクル条件を予め一定条件に設定するとともに、その設定条件下で、標的とされる遺伝子が増幅されるように設計されたプライマーセットを、検出対象とする複数種類の前記微生物のそれぞれについて調整する工程と、検出対象とされる微生物のうち少なくとも一つを含む1種類を含むと思われる試料につき、準備された複数種類のプライマーセットをそれぞれ用いて、設定された前記温度サイクル条件に基づいて増幅反応を行なう工程とを備えることにより、複数種類の微生物を検出対象として、共通の条件で増幅反応を行わせることを可能とするものである。

【0023】なお、本発明の微生物の検出方法は、微生物に由来する遺伝子DNAが、試料中に一定の基準を超えて存在しているか否かを判定するものである。すなわち、PCR法による増幅反応の後、試料中にその遺伝子を鋳型とする増幅産物が生成していれば、当該微生物が含まれる「陽性」と判定し、一方、増幅産物が生成して

いなければ、当該微生物は含まれない「陰性」と判定する。その判定の基準、すなわち増幅反応の感度は、検出の目的や検体の種類などに応じて調整することができる。具体的には、増幅反応のサイクル数や使用するプライマー量を調整することや、後述するネステッドPCR法を適用することなどによって行うことができる。また、本方法では、検出対象とされる微生物に特異的な塩基配列を含む領域を標的とするプライマーセットを用いて、その微生物の遺伝子を持つ特異的に増幅させるため、微生物の同定、すなわち、微生物の属する所定の分類範囲を増幅反応の段階で特定することができる。

【0024】本方法の特徴の一つは、PCR法の温度サイクル条件を予め一定条件に設定するとともに、設定された温度サイクル条件に適するプライマーを、検出対象とする複数種類の微生物について設計することにある。PCR法の温度サイクル条件とは、増幅反応におけるDNAの熱変性による一本鎖化、プライマーのアニールング、及びポリメラーゼ伸長からなる増幅反応の各ステップの温度条件をいう。この中で、熱変性及び伸長反応の温度条件は、主にTaqポリメラーゼの種類によって設定されるが、アニールングの温度条件は主にプライマーの種類によって設定される。詳しくは、通常アニールング温度はプライマーDNAの融解温度 ( $T_m$ ) 値を基準に設定され、 $T_m$  値から5℃程度下げた値を設定することが多い。したがって、本発明では、アニールング温度を複数種類のプライマーで汎用可能な温度領域内に設定するとともに、その設定されたアニールング温度に適する  $T_m$  値を逆算して、その値に近似する  $T_m$  値を持つようなプライマーを設計するという手順を踏まえるとよい。

【0025】検出対象とする微生物の種類は、測定しようとする試料の種類などに応じて選定し、例えば、その測定対象の試料に存在し得る各種微生物を広く網羅するようにして選定することが好ましい。本方法に供する試料には特に制限はないが、人体に対して下痢症状を引き起こす要因となる微生物を検出することを目的とするために、喀痰、血液、及び糞便などの各種臨床試料を生体試料として用いることが可能であり、特に糞便を試料として利用することが好適である。

【0026】本方法で用いるプライマーの設計に際しては、上述したようにその  $T_m$  値に留意する必要がある。 $T_m$  値は正確には実験により求められるが、プライマーの塩基配列から推算することが可能であり、例えば、A又はTを2℃、G又はCを4℃として合計を求める方法がよく用いられている。検出対象とする各微生物について、特異的な塩基配列を持つ標的遺伝子から、目標とする  $T_m$  値を有するプライマーを選択するのは意外と難しいが、プライマーの鎖長を変えることで、その  $T_m$  値をある程度調整することができる。なお、この他にも一般的なプライマーの条件を満たす必要がある。具体的には、15～30塩基程度の鎖長を有すること、センスプ

ライマーとアンチセンスプライマーの $T_m$ 値が近似すること、プライマーが二次構造をとったり自己アニールを起こすような自己相補的配列を含まないこと、二本のプライマー同士がアニールしてプライマーダイマーを形成しないこと、部分的にGCリッチあるいはATリッチな塩基配列が連ならないようにすること、などが挙げられる。

【0027】本方法で用いるプライマーは、常法にしたがって調製すればよい。例えば、DNA合成装置などを用いて所定の塩基配列を有するDNA断片を合成した後、液体クロマトグラフィーなどによって精製して調製することができる。

【0028】また、本方法では、ネステッドPCR法を用いて増幅反応を行うことが好ましい。ネステッドPCR法は二段階PCR法とも呼ばれ、第1段階の増幅産物を鋳型とし、その最初に用いたプライマーセットより内側に設定した別のプライマー（ネステッドプライマー）を用いて、第2段階の増幅反応を行うものである。また、このネステッドPCR法を適用する場合には、第1段階と第2段階のそれぞれの温度サイクル条件を異ならせて増幅反応を行うとよい。具体的には、第1段階のアニーリング温度は45～55℃、好ましくは48～55℃の範囲内で設定するとともに、第2段階のアニーリング温度は55～65℃、好ましくは55～62℃の範囲

内で設定するとよい。この場合、第1段階では、プライマーがアニーリングしやすい比較的穏やかな条件に設定されることから、標的遺伝子を確実に捕捉して感度を優先した増幅反応を行うことができる。一方、第2段階では、プライマーが非相補的な配列にアニーリングしにくいストリンジントな条件に設定されることから、特異性を優先させた増幅反応を行うことができる。

【0029】続いて、本発明の微生物の検出方法を、臨床試料として糞便より採取される試料を測定対象とする微生物の検出系に具体化した一実施形態に基づいて、下痢症状を引き起こす下痢起因性の微生物の特定を行なうための微生物検出系の構築を試みた。

【0030】その具体的手段は、表1乃至表4に示す複数種類のプライマーセットをそれぞれに用いて、一定条件下でPCR法の増幅反応を行なうものである。さらに、本実施形態ではネステッドPCR法を適用し、表1及び表2の(A)～(HH)を第一段階の増幅反応における外側のプライマーとして用いるとともに、表3及び表4の(a)～(hh)を第二段階の増幅反応における内側のネステッドプライマーとして用いる。これらのプライマーセットが標的とする遺伝子、及びその増幅産物の鎖長を下記の表5乃至表7に示す。

【0031】

【表5】

| プライマーセット(1)  |                                      |          |                               |                |     |                   |
|--------------|--------------------------------------|----------|-------------------------------|----------------|-----|-------------------|
| プライマー<br>外+内 | 対象微生物                                | 分類       | 対象遺伝子                         | 増幅産物長<br>外側 内側 |     | 備考<br>(AN=配列番号)   |
| (A)+(a)      | <i>Aeromonas hydrophila</i>          | Bacteria | Enterotoxin(elt)              | 437            | 303 |                   |
| (B)+(b)      | <i>Aeromonas spp.</i>                | Bacteria | 16S rRNA                      | 383            | 248 |                   |
| (C)+(c)      | <i>Bacillus cereus group</i>         | Bacteria | Haemolysin                    | 354            | 202 |                   |
| (D)+(d)      | <i>Bacteroides fragilis</i>          | Bacteria | fragilysin<br>metalloprotease | 417            | 252 |                   |
| (E)+(e)      | <i>Campylobacter jejuni</i>          | Bacteria | Specific 16S rRNA             | 210            | 181 |                   |
| (F)+(f)      | <i>Campylobacter<br/>jejuni/coli</i> | Bacteria | Group 16S rRNA                | 541            | 276 |                   |
| (G)+(g)      | <i>Campylobacter spp.</i>            | Bacteria | Specific 16S rRNA             | 353            | 101 |                   |
| (H)+(h)      | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | A toxin                       | 374            | 163 | AN15,16+AN129,130 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | B neurotoxin                  | 302            | 186 | AN17,18+AN131,132 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | C1 neurotoxin                 | 354            | 283 | AN19,20+AN133,134 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | C2 neurotoxin                 | 398            | 232 | AN21,22+AN135,136 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | D toxin                       | 385            | 164 | AN23,24+AN137,138 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | E toxin                       | 340            | 178 | AN25,26+AN139,140 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | F toxin                       | 420            | 187 | AN27,28+AN141,142 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | Botulinum toxin<br>A/B        | 336            | 141 | AN29,30+AN143,144 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | Botulinum toxin C             | 339            | 141 | AN31,32+AN145,146 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>         | Bacteria | Botulinum Toxin<br>E/F        | 500            | 336 | AN33,34+AN147,148 |
| (I)+(i)      | <i>Clostridium butyricum</i>         | Bacteria | toxin : enterotoxin           | 361            | 230 |                   |
| (J)+(j)      | <i>Clostridium difficile</i>         | Bacteria | 16S rRNA                      | 317            | 210 | AN37,38+AN151,152 |
|              | <i>Clostridium difficile</i>         | Bacteria | toxin A                       | 381            | 163 | AN39,40+AN153,154 |
|              | <i>Clostridium difficile</i>         | Bacteria | toxin B                       | 340            | 224 | AN41,42+AN155,156 |

【0032】

【表6】

プライマーセット(2)

| プライマー<br>外・内 | 対象微生物                               | 分類       | 対象遺伝子                     | 増幅産物長<br>外側   内側 | 備考<br>(AN=配列番号)   |
|--------------|-------------------------------------|----------|---------------------------|------------------|-------------------|
| (K)+(k)      | <i>Clostridium perfringens</i>      | Bacteria | 16S rRNA                  | 360   116        | AN43,44+AN157,158 |
|              | <i>Clostridium perfringens</i>      | Bacteria | toxin:ent                 | 345   232        | AN45,46+AN159,160 |
| (L)+(l)      | <i>Cryptosporidium parvum</i>       | Protozoa | HSP70                     | 357   229        |                   |
| (M)+(m)      | <i>Entamoeba histolytica</i>        | Protozoa | HSP protein:P30 gene      | 341   251        |                   |
| (N)+(n)      | <i>Escherichia coli</i><br>(EaggEC) | Bacteria | pCVD432                   | 630   250        | AN51,62+AN165,166 |
|              | <i>Escherichia coli</i><br>(EaggEC) | Bacteria | EAST1                     | 175   92         | AN53,54+AN167,168 |
| (O)+(o)      | <i>Escherichia coli</i> (EIEC)      | Bacteria | virB                      | 328   170        |                   |
| (P)+(p)      | <i>Escherichia coli</i><br>(EHEC)   | Bacteria | Shiga toxin 1             | 378   248        | AN57,58+AN171,172 |
|              | <i>Escherichia coli</i><br>(EHEC)   | Bacteria | Shiga toxin 2             | 413   307        | AN59,60+AN173,174 |
| (Q)+(q)      | <i>Escherichia coli</i> (ETEC)      | Bacteria | toxin:LT toxin            | 297   198        | AN61,62+AN175,176 |
|              | <i>Escherichia coli</i><br>(ETEC)   | Bacteria | ST1 toxin                 | 171   109        | AN63,64+AN177,178 |
|              | <i>Escherichia coli</i><br>(ETEC)   | Bacteria | ST II toxin               | 321   245        | AN65,66+AN179,180 |
| (R)+(r)      | <i>Escherichia coli</i>             | Bacteria | toxin:intimin;ese         | 386   230        |                   |
| (S)+(s)      | <i>Giardia lamblia group</i>        | Protozoa | 18S rRNA                  | 439   210        |                   |
| (T)+(t)      | <i>Listeria monocytogenes</i>       | Bacteria | listeriolysin O<br>(hlyA) | 390   263        | AN71,72+AN185,186 |
|              | <i>Listeria monocytogenes</i>       | Bacteria | listeriolysin             | 336   151        | AN73,74+AN187,188 |
| (U)+(u)      | <i>Plesiomonas shigelloides</i>     | Bacteria | group 16S rRNA            | 409   171        |                   |
| (V)+(v)      | <i>Salmonella spp.</i>              | Bacteria | toxin: enterotoxin<br>ent | 347   202        | AN77,78+AN191,192 |
|              | <i>Salmonella spp.</i>              | Bacteria | virulence:invA            | 422   237        | AN79,80+AN193,194 |
| (W)+(w)      | <i>Salmonella typhi</i>             | Bacteria | virulence:vipR            | 409   259        |                   |
| (X)+(x)      | <i>Shigella flexneri</i>            | Bacteria | Inv G factor              | 379   164        |                   |
| (Y)+(y)      | <i>Staphylococcus aureus</i>        | Bacteria | toxin:SEA                 | 430   212        | AN85,86+AN199,200 |
|              | <i>Staphylococcus aureus</i>        | Bacteria | toxin:SEB                 | 368   226        | AN87,88+AN201,202 |
|              | <i>Staphylococcus aureus</i>        | Bacteria | toxin:SEC                 | 391   251        | AN89,90+AN203,204 |
|              | <i>Staphylococcus aureus</i>        | Bacteria | toxin:SED                 | 341   249        | AN91,92+AN205,206 |
|              | <i>Staphylococcus aureus</i>        | Bacteria | toxin:SEE                 | 439   192        | AN93,94+AN207,208 |

【0033】

【表7】

プライマーセット(3)

| プライマー<br>外・内 | 対象微生物  | 分類       | 対象遺伝子             | 増幅産物長<br>外側   内側 | 備考<br>(AN=配列番号)   |
|--------------|--|----------|-------------------|------------------|-------------------|
| (Z)+(z)      | <i>Tropheryma whippelii</i><br>(Whipple Disease) | Bacteria | 16S rRNA          | 360   156        | AN95,96+AN209,210 |
|              | <i>Tropheryma whippelii</i><br>(Whipple Disease) | Bacteria | 16S rRNA          | 325   299        | AN97,98+AN211,212 |
| (AA)+(aa)    | <i>Vibrio cholerae</i>                           | Bacteria | toxin:CTA         | 494   223        |                   |
| (BB)+(bb)    | <i>Vibrio cholerae/mimicus</i>                   | Bacteria | Group 16S rRNA    | 330   226        |                   |
| (CC)+(cc)    | <i>Vibrio fluvialis</i>                          | Bacteria | 16S rRNA          | 431   342        |                   |
| (DD)+(dd)    | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                   | Bacteria | Specific 16S rRNA | 425   278        |                   |
| (EE)+(ee)    | <i>Vibrio parahaemolyticus group</i>             | Bacteria | haemolysin(Tdh)   | 368   245        |                   |
| (FF)+(ff)    | <i>Vibrio spp.</i>                               | Bacteria | Group 16S rRNA    | 450   234        |                   |
| (GG)+(gg)    | <i>Yersinia enterocolitica</i>                   | Bacteria | Group 16S rRNA    | 378   290        |                   |
| (HH)+(hh)    | <i>Yersinia enterocolitica group</i>             | Bacteria | Group 16S rRNA    | 316   234        |                   |

【0034】各プライマーセットの標的は、リボゾームRNA (rRNA)、熱ショックタンパク質 (HSP) をコードする遺伝子、及びボツリヌス毒素及び腸管毒素などの種々の毒素 (toxin) などをコードする遺伝子をそれぞれ対象としている。

【0035】次いで、表1乃至表4に示すプライマーセ

ットが検出対象とする各微生物について説明する。なお、以下の説明では便宜上、プライマーセット(A)～(HH)のみを表記しているが、ネステッドプライマーのセット(a)～(hh)を組み合わせて用いる場合を含むものとする。

【0036】プライマーセット(A)は、エロモナス・ヒ

ドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*) の細菌を検出対象とし、プライマーセット (B) は、エロモナス (*Aeromonas*) 属を検出対象とする。エロモナス属の細菌は、淡水中の常在菌であり、運動性のあるグラム陰性桿菌であり、エロモナス・ヒドロフィラ及びエロモナス・ソブリア (*A. sobria*) は、食中毒の原因菌となっている。さらに、日和見感染症として、敗血症、創傷感染、心内膜炎などを引き起こすこともある。

【0037】プライマーセット (C) は、バシラス・セレウス (*Bacillus cereus* group) 群を検出対象とする。バシラス・セレウスは、毒素型食中毒を起こし、下痢、腹痛を伴う下痢型と、吐気及び嘔吐を伴う嘔吐型の二つのタイプがある。

【0038】プライマーセット (D) は、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) を検出対象とする。バクテロイデス・フラジリスは、糞便中の最優勢菌群であり、腹腔内感染症や敗血症を起こす。

【0039】プライマーセット (E) は、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) の細菌を検出対象とし、プライマーセット (F) は、カンピロバクター・ジェジュニ／コリ (*Campylobacter jejuni/coli*) の細菌を検出対象とし、プライマーセット (G) は、カンピロバクター (*Campylobacter*) 属の細菌を検出対象とするものである。これらの微生物は、下痢や食中毒の起因菌となり、特に、小児集団食中毒や乳幼児下痢症の原因菌となる。これらは、感染後に腸管粘膜へ侵入し、下痢、発熱、腹痛、嘔吐などの症状を起こす。また、カンピロバクター・ジェジュニ／コリは、主に牛、鶏、豚などが保菌しているため、これらが感染源となることが多い。

【0040】プライマーセット (H) は、クロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*, ボツリヌス菌) の細菌を検出対象とするものである。ボツリヌス菌は、嫌気性で増殖し、神経毒による食中毒を引き起こす (ボツリヌス中毒)。ボツリヌス毒素は腸管から吸収され、筋肉の麻痺を起こす。特に、死亡率が高い場合もあり、早期治療を必要とするものである。

【0041】プライマーセット (I) は、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (J) は、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) の細菌を検出対象とするものである。クロストリジウム・ブチリカムは、グラム陽性偏性嫌気性細菌であり、その神経毒素産生性株は、食中毒を引き起こす。一方、クロストリジウム・ディフィシレは、リンコマイシンやクリンダマイシンなどの抗生物質投与後に起こる偽膜性大腸炎の原因菌となる。抗生物質の投与による大腸細菌叢の乱れによるものであり、症状は腹痛、下痢、発熱、及び白血球増加が見られる。

【0042】プライマーセット (K) は、クロストリジ

ウム・パーフリンゲンス (*Clostridium perfringens*, ウェルシュ菌) の細菌を検出対象とするものであり、耐熱性の芽胞が生存し、かつ酸素のない腸管に入って嫌気性菌に増殖し、生体内毒素を産生するものである。これにより、ガス壊疽や食中毒の原因菌となる。

【0043】プライマーセット (L) は、クリプトスポリジウム・パルブム (*Cryptosporidium parvum*) の原生動物を検出対象とするものであり、水系の汚染を感染源として下痢を特徴とするクリプトスポリジウム症を起こす病原虫として知られている。プライマーセット (M) は、エントアメーバ・ヒストリティカ (*Entamoeba histolytica*, 赤痢アメーバ) の原生動物を検出対象とするものであり、下痢、粘血便の赤痢様症状を呈する。原虫は、血行性に転移し、肝、肺、脳に腫瘍を作ることがある。

【0044】プライマーセット (N) は、腸管凝集付着性大腸菌 (エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli* (EagEC))) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (O) は、腸管組織侵入性大腸菌 (エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli* (IEC))) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (P) は、腸管出血性大腸菌 (エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli* (EHEC))) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (Q) は、毒素原性大腸菌 (エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli* (ETEC))) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (R) は、大腸菌 (*Escherichia coli*) の病原因子の一つであるインティミン (intimin (接着因子)) 産生遺伝子 (*eaeA*) を検出対象とする。大腸菌は、ヒトや動物の腸管に存在する常在菌であり、糞便中に含まれている。さらに、詳しく説明すると、腸管凝集付着性大腸菌は、遷延性下痢、発熱、腹痛、悪心、嘔吐の症状を呈し、腸管組織侵入性大腸菌は、粘血便、発熱、嘔気、腹痛、嘔吐の症状を呈し、腸管出血性大腸菌は、血便、腹痛、嘔吐、嘔気、発熱の症状を呈し、毒素性大腸菌は水様性下痢、腹痛、発熱、嘔吐の症状を呈することがある。

【0045】プライマーセット (S) は、ギアルディア・ランブリア (*Giardia lamblia* group, ランブル鞭毛虫) の原生動物を検出対象とするものであり、脂肪性の下痢、栄養不良、胆嚢炎など症状を起こす。また、プライマーセット (T) は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) の細菌を検出対象とするものであり、成人では日和見感染を起こす。症状は、髄膜炎、敗血症、心内膜症、肺炎を呈することがあり、致死率の高い細菌である。プライマーセット (U) は、プレジオモナス・シゲロイデス (*Plesiomonas shigelloides*) の細菌を検出対象とするものであり、淡水中に常在し、淡水魚などを通じて経口感染を起こし、急性胃腸炎の原因となる。

【0046】プライマーセット (V) は、サルモネラ属

(*Salmonella* spp.) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (W) は、サルモネラ・タイフィ (*Salmonella typhi*, チフス菌) の細菌を検出対象とするものである。サルモネラ属菌は、2つの臨床病型に分けられ、いずれも経口感染する。チフス菌またはパラチフス菌によって発症するチフス症 (腸チフス・パラチフス) は、敗血症を起こし、高熱、バラ疹、腫瘍などの症状を呈する。一方、上記以外に属するサルモネラ属は、発熱、下痢、腹痛などを伴う急性胃腸炎症状を呈する食中毒の原因菌となる。プライマーセット (X) は、シゲラ・フレクスネリ (*Shigella flexneri*, フレクスナー赤痢菌) の細菌を検出対象とするものであり、粘血性の便や、発熱、膿、しぶり腹などの症状を呈する。

【0047】プライマーセット (Y) は、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*, 黄色ブドウ球菌) の細菌を検出対象とするものであり、黄色ブドウ球菌は主な症状として、化膿性炎症、食中毒、ブドウ球菌性皮膚剥脱症候群、毒素性ショック症候群などを引き起こす。プライマーセット (Z) は、トロフェリマ・ウィッペリ (*Tropheryma whippelii* (Whipple's Disease)) の細菌を検出対象とするものであり、トロフェリマ・ウィッペリは、膠原病の一種である Whipple disease の原因菌とされるものである。

【0048】プライマーセット (AA) は、ビブリオ・コレラ (*Vibrio cholerae*, コレラ菌) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (BB) は、ビブリオ・コレラ／ミミカス (*Vibrio cholerae/mimicus*) の細菌を検出するものであり、プライマーセット (CC) は、ビブリオ・フルビアリス (*Vibrio fluvialis*) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (DD) は、ビブリオ・パラヘモリティカス (*Vibrio parahaemolyticus*, 腸炎ビブリオ) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (EE) は、ビブリオ・パラヘモリティカス群 (*Vibrio parahaemolyticus* group) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (FF) は、ビブリオ属 (*Vibrio* spp.) の細菌を検出対象とするものである。コレラ菌は、激しい水様性の下痢を発症する。また、ビブリオ・ミミカス及びビブリオ・フルビアリスは、海水や河水中に存在し、魚介類を介して食中毒を起こす原因菌となる。さらに、腸炎ビブリオは、海水中に生息する好塩菌であり、汚染された魚介類を経口摂取することにより発症し、下痢、腹痛、嘔吐、発熱などの症状を引き起こす。

【0049】プライマーセット (GG) は、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) の細菌を検出対象とするものであり、プライマーセット (HH) は、エルシニア・エンテロコリチカ群 (*Yersinia enterocolitica* group) の細菌を検出対象とするものである。エルシニア・エンテロコリチカは、豚や犬などの腸管に分布し、急性胃腸炎 (食中毒)、終末回

腸炎、腸管膜リンパ節炎、虫垂炎、結節性紅斑、関節炎、敗血症などを引き起こす。

【0050】次いで、上記の各プライマーセットを用いる微生物の検出方法の操作手順を、図1を参照しながら説明する。本実施形態では、図1に示すように、DNAの抽出、PCR法 (ネステッドPCR) による増幅反応、及び増幅産物の検出の三段階によって、微生物の検出操作を行う。すなわち、PCR増幅反応を主として、その前後の工程で必要な処理を行う。

【0051】まず、PCRの実施に先立ち、試料中に含まれる (と思われる) 微生物の細胞から、遺伝子DNAを抽出するための操作が行われる。具体的には、タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) 処理や変性剤などによって化学的に細胞を破壊し、あるいはビーズや超音波処理などによって物理的に細胞を破壊することなどにより、DNAを抽出する。

【0052】続いて、ネステッドPCR法による二段階の増幅反応が行われる。第1段階では、先にDNAを抽出した試料について、表1及び表2に示す外側のプライマーセット (A)~(H) をそれぞれに用いて増幅反応を行う。詳しくは、図1に示すように、反応液 R1a, R1b, R1c... には、(A), (B), (C)... のプライマーセットが添加されており、これらの反応液を共通の温度サイクル条件 T1 下で制御することによって増幅反応を行う。ここで温度サイクル条件 T1 は、そのアニーリング温度が 45~55℃、好ましくは 48~55℃ の範囲内で設定される。

【0053】次の第2段階では、第1段階の各反応液 R1a, R1b, R1c... を一部採取し、これを試料として、表3及び表4に示す内側のプライマー (ネステッドプライマー) のセット (a)~(h) をそれぞれに用いる。詳しくは、反応液 R2a, R2b, R2c... には、(a), (b), (c)... のプライマーセットが添加されており、これらの反応液を共通の温度サイクル条件 T2 下で制御することによって、再度増幅反応を行う。ここで温度サイクル条件 T2 は、そのアニーリング温度が 55~65℃、好ましくは 55~62℃ の範囲内で設定される。

【0054】このように、複数種類のプライマーセットを用いることにより、各プライマーセットについて特異性の高い検出が可能となる。また、温度サイクル条件 T1, T2 が、各プライマーセット間で共通化されていることから、その増幅反応を同時に行わせることができ、検出操作の能率を向上させることができる。

【0055】生成した増幅産物の検出は、電気泳動法又はハイブリダイゼーション法により行う。電気泳動法では、エチジウムブロマイドなどにより泳動後のゲルを染色し、表5乃至表7に示す鎖長を持つ増幅産物を検出することにより、目的とする遺伝子が増幅されているかを確認することができる。また、ハイブリダイゼーション

法では、その増幅産物に特異的なDNAプローブを用いることによって検出することができる。

【0056】以上のように、本実施形態の微生物の検出方法によれば、広範囲の微生物を検出対象としながら、複数種類のプライマーセットを用いて共通の条件下で同時に増幅させることができる。また、ネステッドPCRを適用することによって、きわめて高感度の検出が可能であり、およそ $10 \sim 100 \text{ cell/ml}$ という低濃度の微生物の遺伝子を捕捉することができる。これらについては、後述する実施例における実験結果によって証明する。

【0057】本実施形態の微生物の検出方法は、前述したように生体試料中の微生物の存在（汚染）を検出するといった目的に、特に好適に用いることができる。すなわち、微生物の特定を特に迅速に行なう必要が有る場合に、対象となる微生物の同定をきわめて簡便な操作によって調べることができる。

【0058】ところで、上述した実施形態では、高感度の検出を必要としない場合、例えば、微生物が高濃度に含まれる試料について、その同定を主目的とするような場合は、通常のPCR法による一段階のみの増幅反応で十分である。したがって、まず第1段階の外側の増幅反応を行い、ここで目的とする微生物の遺伝子が良好に増幅されていると判断されれば、その後の第2段階を省略しても差し支えない。この場合は、表5乃至表7における外側の増幅産物の鎖長を基に確認することによって、目的とする増幅産物の確認を行うことができる。

【0059】また、(A)～(HH)及び(a)～(hh)のいずれか一方の組み合わせのプライマーセットにより、通常の（一段階のみの）PCR法を行うようにしてもよい。この場合、いずれの組み合わせのプライマーセットを用いるかによって、温度サイクル条件を変更する必要がある。すなわち、前者の場合はそのアニーリング温度を $45 \sim 55^\circ\text{C}$ の範囲内で、後者の場合は $55 \sim 65^\circ\text{C}$ の範囲内で設定する。

【0060】また、(A)～(HH)（又は(a)～(hh)）の57種類全てのプライマーセットを同時に使用する必要はない。その都度、必要とされるプライマーセットを取捨選択して使用すればよく、あるいは他種類の微生物を検出するためのプライマーセットをさらに組み合わせても構わない。

【0061】本実施形態の微生物の検出方法を行ううえで必要な成分を、予めセットしたキットとして商業的に

供給することができる。例えば、表1乃至表4に示す各プライマーセットを別々の容器の内部に予め付着させ、この状態でユーザーに供給する。この場合、ユーザーは試料とともにPCR反応に必要な酵素（Taqポリメラーゼ）やdNTPなどを含む緩衝液（PCR反応液）をこの容器に入れ、PCR装置にセットするだけでよい。PCR反応液としては、市販されている様々なPCRキットからユーザーが適宜選択して用いることができる。

【0062】なお、本発明の微生物の検出方法は、上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に記載された範囲を逸脱しない限りにおいて変更が可能である。例えば、プライマーセットは標的とする微生物の遺伝子を特異的に検出可能であれば、異なる塩基配列を持つものであってもよい。また、例えば、検出対象とする微生物は、検出の目的や測定しようとする試料の種類（環境試料及び生体試料）などに応じて任意に選択すればよい。すなわち、本発明に基づく方法論は、プライマーの塩基配列や微生物の種類、測定試料などに制限はなく、あらゆるものを対象として適用可能である。ただし、測定に供する試料の種類によっては、増幅反応を阻害するような不純物が反応液に混入する可能性がある。このような場合は、PCRの実施に先立ち、試料から核酸成分を抽出するとともに不純物を除去する前処理を念に施すことで、本発明の特徴である高い検出感度を維持することができる。

【0063】また、例えば、ホットスタートPCRやリアルタイムPCR、マイクロプレートPCR、キャピラリーPCRなど、他種類のPCRの変法・改良法を、試験の目的に応じて適宜利用してもよい。これによって、本発明の応用範囲を様々な分野に広げることができる。

【0064】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明はこの実施例で示す方法に限定されるものではない。本実施例では、表1乃至表4に示すプライマーセットの性能を確認するための試験を行った。供試試料としてのプライマーセットは、表1乃至表4の塩基配列を持つDNA断片を、定法にしたがって調製して用いた。また、供試微生物としては、下記の表8及び表9に示す基準株を用いた。これらを菌種に合わせた培地で培養し、対数増殖期の菌体を滅菌超純水にて希釈して、所定の濃度の菌液を調製した。

【0065】

【表8】



供試微生物(基準株) - 1

| No.    | 名称                               | 使用菌株No.   | 分類       |
|--------|----------------------------------|---|----------|
| (1)-1  | <i>Aeromonas hydrophila</i>      | GTC140(GIFU3173)  | Bacteria |
| (1)-2  | <i>Aeromonas spp.</i>            | GTC140(GIFU3173(A. hydrophila)/GIFU11325(A. sobria))                                      | Bacteria |
| (2)-1  | <i>Bacillus cereus group</i>     | GIFU12028   | Bacteria |
| (3)    | <i>Bacteroides fragilis</i>      | GTC1774(GAI96447)   | Bacteria |
| (4)-1  | <i>Campylobacter jejuni</i>      | GTC259(GIFU8734)  | Bacteria |
| (4)-2  | <i>Campylobacter coli</i>        | GTC1672(GIFU8733)   | Bacteria |
| (4)-3  | <i>Campylobacter spp.</i>        | GTC259(GIFU8734(C. jejuni))/<br>GTC1672(GIFU8733(C. coli))/<br>GTC526(GIFU8735(C. fetus)) | Bacteria |
| (5)-1  | <i>Clostridium botulinum</i>     | GTC1788(KZ532)  | Bacteria |
| (5)-2  | <i>Clostridium botulinum</i>     | GTC1789(KZ533)  | Bacteria |
| (5)-3  | <i>Clostridium botulinum</i>     | GTC1790(KZ536)  | Bacteria |
| (5)-4  | <i>Clostridium botulinum</i>     | GTC1791(KZ537)  | Bacteria |
| (5)-5  | <i>Clostridium botulinum</i>     | GTC1792(KZ582)  | Bacteria |
| (5)-6  | <i>Clostridium botulinum</i>     | GTC1793(KZ582)  | Bacteria |
| (6)    | <i>Clostridium butyricum</i>     | GTC1351   | Bacteria |
| (7)    | <i>Clostridium difficile</i>     | GTC180(GIFU7626)  | Bacteria |
| (8)    | <i>Clostridium perfringens</i>   | GTC166(GIFU5258)  | Bacteria |
| (9)    | <i>Cryptosporidium parvum</i>    | environment   | Protozoa |
| (10)   | <i>Entamoeba histolytica</i>     | environment   | Protozoa |
| (11)-1 | <i>Escherichia coli (EaggEC)</i> | GTC840  | Bacteria |
| (11)-2 | <i>Escherichia coli (EaggEC)</i> | GTC837  | Bacteria |
| (11)-3 | <i>Escherichia coli (EIEC)</i>   | GTC1058   | Bacteria |
| (11)-4 | <i>Escherichia coli (EHEC)</i>   | GTC1061   | Bacteria |
| (11)-5 | <i>Escherichia coli (ETEC)</i>   | GTC1066   | Bacteria |
| (11)-6 | <i>Escherichia coli (ETEC)</i>   | GTC1065   | Bacteria |
| (12)   | <i>Giardia lamblia group</i>     | environment   | Protozoa |
| (13)   | <i>Listeria monocytogenes</i>    | GTC149(GIFU3188)  | Bacteria |
| (14)   | <i>Plesiomonas shigelloides</i>  | GTC410(GIFU11339)   | Bacteria |
| (15)   | <i>Salmonella spp.</i>           | GTC105(S. typhi)/<br>GTC133(S. typhimurium)/<br>GTC131(S. enteritidis)                    | Bacteria |

※GTC:Department of Microbiology, Gifu University School of Medicine

KZ :Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University

GAI :Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine

【 0066 】

【 表 9 】

供試微生物(基準株) - 2

| No.    | 名称   | 使用菌株No.                                   | 分類       |
|--------|--|---|----------|
| (16)   | <i>Salmonella typhi</i>                          | GTC105(GIFU2922)                          | Bacteria |
| (17)   | <i>Shigella flexneri</i>                         | GTC282(GIFU8908)                          | Bacteria |
| (18)-1 | <i>Staphylococcus aureus</i>                     | GTC1770                                   | Bacteria |
| (18)-2 | <i>Staphylococcus aureus</i>                     | GTC1771                                   | Bacteria |
| (18)-3 | <i>Staphylococcus aureus</i>                     | GTC1772                                   | Bacteria |
| (18)-4 | <i>Staphylococcus aureus</i>                     | GTC1773                                   | Bacteria |
| (18)-5 | <i>Staphylococcus aureus</i>                     | GTC1782                                   | Bacteria |
| (19)   | <i>Tropheryma whippelii</i><br>(Whipple Disease) | environment                               | Bacteria |
| (20)-1 | <i>Vibrio cholerae</i>                           | GTC37                                     | Bacteria |
| (20)-2 | <i>Vibrio cholerae/mimicus</i>                   | GTC37(V. cholerae)/<br>GTC334(V. mimicus) | Bacteria |
| (20)-3 | <i>Vibrio fluvialis</i>                          | GIFU8917                                  | Bacteria |
| (20)-4 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                   | GTC41                                     | Bacteria |
| (20)-5 | <i>Yersinia enterocolitica</i>                   | GTC127(GIFU3138)                          | Bacteria |

※GTC:Department of Microbiology, Gifu University School of Medicine

KZ :Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University

GAI :Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine

【 0067 】実験の操作手順は、図1に示すようにDNAの抽出、PCR反応、増幅産物の検出の各工程の順序にしたがって行った。以下、各工程毎にその条件を記す。

【 0068 】DNAの抽出は、各微生物の菌液500μlに、糞便中の非病原性微生物の代用として、E. Coli DH5αの菌液を終濃度10<sup>8</sup>cell/mlになるように添加し、12000×gにて10分間遠心分離した。そして、上清を取り除いた後の沈さに、0.1mm径ガラ

スビーズ100mgおよび1mm径ジルコニアビーズを1粒添加し、FastPrep mixer (フナコシ株式会社)を用いて、speed=5.5, time=30の破碎条件にて物理的に細胞を破碎した。

【 0069 】そして、アクロモバクター属性溶菌酵素(アクロモペプチターゼ)を終濃度500μg/mlになるように添加し、55℃にて20分間インキュベート後、さらにSDS (Sodium dodecyl sulfate)を終濃度2%、蛋白質分解酵素 (proteinaseK)を終濃度50μ

g/ml になるように添加し、55℃にて20分間インキュベートした。

【0070】そして、100℃で3分間加熱し、氷上で1分間冷却後、塩化ナトリウムを終濃度2.5Mになるように添加し、よく懸濁したのち、室温にて20分間静置した。さらに、12000×gにて10分間遠心分離し、上清を除去後、ビーズに滅菌水100μlを添加・攪拌したものを次工程のPCRの試料として用いた。

【0071】PCR法による増幅反応は、PCRキットとしてHotStarTaq DNA polymerase (株式会社キアゲン)を用いて行った。反応液の組成は、第1段階の増幅反応の場合、10μlの試料に、4μlの10×PCR緩衝液(pH8.7)と、プライマーセット(終濃度0.4μM)、dNTP(同0.25mM)、Taqポリメラーゼ(同0.0125unit/μl)、及びMgCl<sub>2</sub>(同1.5mM)の各成分とを加え、全液量が20μlとなるように滅菌超純水で希釈して調製した。また、第2段階の増幅反応の場合は、第1段階の増幅反応による反応液を1μl採取して試料とし、第1段階の増幅反応と同様の組成の反応液を調製して用いた。

【0072】PCR装置として、GeneAmp PCR System 9700 (PERKIN ELMER Corporation)を用いて、次に示す温度サイクル条件にて制御することにより行った。第1段階の温度サイクルは、熱変性:94℃/20秒、アニーリング:50℃/30秒、伸長反応:74℃/40秒で行い、第2段階の温度サイクルは、アニーリングを6

0℃/30秒に変更して行った。また、この温度サイクルを、第1段階及び第2段階のそれぞれについて30サイクル繰り返して増幅反応を行った。

【0073】PCRにより得られた増幅産物は、1%アガロースゲルを用いた電気泳動法により泳動した後、エチジウムブロマイドにより染色してその鎖長を確認した。なお、各増幅産物の鎖長は表5乃至表7に示す数値を基準とした。

【0074】本実施例では、微生物の検出感度及び特異性をそれぞれ確認するための試験を行った。検出感度の試験は、表8及び表9に示す各微生物の基準株について、 $2 \times 10^7 \sim 2 \text{ cell/ml}$  (PCR反応液として $10^7 \sim 1 \text{ cell/ml}$ )となるように段階希釈した菌液を調製し、これを試料として、上記各工程の手順にしたがって検出操作を行った。その実験の結果を表10乃至表12に示す。ここで、それぞれの表中に菌数は“cell/ml”の単位で示してある。また、各項目の“○”は、検出有りを示し、“×”は、不検出を示している。表10乃至表12から明らかな示されるように、ネステッドPCR法を用いることにより、検出感度を飛躍的に向上させることが可能であり、いずれの微生物においても、 $10 \sim 100 \text{ cell/ml}$ レベルでの検出が可能であった。

【0075】

【表10】

実験結果(検出感度) - 1

| プライマー<br>外+内 | 対象微生物                            | 対象遺伝子                 | 第1段階(外側)<br>／菌数 |                 |                 |                 | 第2段階(内側)<br>／菌数 |                 |                 |   | 備考<br>(AN=配列番号)   |
|--------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|-------------------|
|              |                                  |                       | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>5</sup> | 1 |                   |
| (A)+(a)      | <i>Aeromonas hydrophila</i>      | Enterotoxin (elt)     | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                   |
| (B)+(b)      | <i>Aeromonas spp.</i>            | 16S rRNA              | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                   |
| (C)+(c)      | <i>Bacillus cereus</i> group     | Haemolysin            | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × |                   |
| (D)+(d)      | <i>Bacteroides fragilis</i>      | fragilysin metaloprot | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                   |
| (E)+(e)      | <i>Campylobacter jejuni</i>      | Specific 16S rRNA     | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × |                   |
| (F)+(f)      | <i>Campylobacter jejuni/coli</i> | Group 16S rRNA        | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × |                   |
| (G)+(g)      | <i>Campylobacter spp.</i>        | Specific 16S rRNA     | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × |                   |
| (H)+(h)      | <i>Clostridium botulinum</i>     | A toxin               | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN15,16+AN129,130 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | B neurotoxin          | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN17,18+AN131,132 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | C1 neurotoxin         | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN19,20+AN133,134 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | C2 neurotoxin         | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN21,22+AN135,136 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | D toxin               | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN23,24+AN137,138 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | E toxin               | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN25,26+AN139,140 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | F toxin               | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN27,28+AN141,142 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | Botulinum toxin A/B   | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN29,30+AN143,144 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | Botulinum toxin C     | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN31,32+AN145,146 |
|              | <i>Clostridium botulinum</i>     | Botulinum Toxin E/F   | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN33,34+AN147,148 |
| (I)+(i)      | <i>Clostridium butyricum</i>     | toxin enterotoxi      | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × |                   |
| (J)+(j)      | <i>Clostridium difficile</i>     | 16S rRNA              | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN37,38+AN151,152 |
|              | <i>Clostridium difficile</i>     | toxin A               | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN39,40+AN153,154 |
|              | <i>Clostridium difficile</i>     | toxin B               | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN41,42+AN155,156 |
| (K)+(k)      | <i>Clostridium perfringens</i>   | 16S rRNA              | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN43,44+AN157,158 |
|              | <i>Clostridium perfringens</i>   | toxin:ent             | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN45,46+AN159,160 |
| (L)+(l)      | <i>Cryptosporidium parvum</i>    | HSP70                 | —               | —               | —               | —               | —               | —               | —               | — |                   |
| (M)+(m)      | <i>Entamoeba histolytica</i>     | HSP protein:P30 gene  | —               | —               | —               | —               | —               | —               | —               | — |                   |

【0076】

【表11】

実験結果(検出感度)-2

| プライマー<br>外+内 | 対象微生物  | 対象遺伝子                        | 第1段階(外側)<br>／菌数 |                 |                 |                 | 第2段階(内側)<br>／菌数 |                 |                 |   | 備考<br>(AN=配列番号)   |
|--------------|--|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|-------------------|
|              |  |                              | 10 <sup>7</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>1</sup> | 1 |                   |
| (N)+(n)      | <i>Escherichia coli</i><br>(EaggEC)                        | pCVD432                      | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN51,52+AN185,186 |
|              | <i>Escherichia coli</i><br>(EaggEC)                        | EAST1                        | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN53,54+AN187,188 |
| (O)+(o)      | <i>Escherichia coli</i><br>(EIEC)                          | virB                         | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                   |
| (P)+(p)      | <i>Escherichia coli</i><br>(EHEC)                          | Shiga toxin<br>1             | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN57,58+AN171,172 |
|              | <i>Escherichia coli</i><br>(EHEC)                          | Shiga toxin<br>2             | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN59,60+AN173,174 |
| (Q)+(q)      | <i>Escherichia coli</i><br>(ETEC)                          | toxin:LT<br>toxin            | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN61,62+AN175,176 |
|              | <i>Escherichia coli</i><br>(ETEC)                          | ST1 toxin                    | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN63,64+AN177,178 |
|              | <i>Escherichia coli</i><br>(ETEC)                          | ST II toxin                  | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN65,66+AN179,180 |
| (R)+(r)      | <i>Escherichia coli</i>                                    | toxin:intimi<br>n:ese        | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                   |
| (S)+(s)      | <i>Giardia lamblia</i><br>group                            | 18S rRNA                     | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | - |                   |
| (T)+(t)      | <i>Listeria</i><br><i>monocytogenes</i>                    | listeriolysin<br>O (hlyA)    | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN71,72+AN185,186 |
|              | <i>Listeria</i><br><i>monocytogenes</i>                    | listeriosin                  | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN73,74+AN187,188 |
| (U)+(u)      | <i>Plesiomonas</i><br><i>shigelloides</i>                  | group 16S<br>rRNA            | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                   |
| (V)+(v)      | <i>Salmonella</i> spp.                                     | toxin:<br>enterotoxin<br>ent | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN77,78+AN191,192 |
|              | <i>Salmonella</i> spp.                                     | virulence:in<br>vA           | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × | AN79,80+AN193,194 |
| (W)+(w)      | <i>Salmonella typhi</i>                                    | virulence<br>vipR            | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                   |
| (X)+(x)      | <i>Shigella flexneri</i>                                   | Inv G<br>factor              | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                   |
| (Y)+(y)      | <i>Staphylococcus</i><br><i>aureus</i>                     | toxin:SEA                    | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN85,86+AN199,200 |
|              | <i>Staphylococcus</i><br><i>aureus</i>                     | toxin:SEB                    | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN87,88+AN201,202 |
|              | <i>Staphylococcus</i><br><i>aureus</i>                     | toxin:SEC                    | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN89,90+AN203,204 |
|              | <i>Staphylococcus</i><br><i>aureus</i>                     | toxin:SED                    | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN91,92+AN205,206 |
|              | <i>Staphylococcus</i><br><i>aureus</i>                     | toxin:SEE                    | ○               | ○               | ×               | ×               | ○               | ○               | ×               | × | AN93,94+AN207,208 |
| (Z)+(z)      | <i>Tropheryma</i><br><i>whippelii</i> (Whipple<br>Disease) | 16S rRNA                     | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | - | AN95,96+AN209,210 |
|              | <i>Tropheryma</i><br><i>whippelii</i> (Whipple<br>Disease) | 16S rRNA                     | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | - | AN97,98+AN211,212 |

【0077】

【表12】

実験結果(検出感度)-3

| プライマー<br>外+内 | 対象微生物   | 対象遺伝子                | 第1段階(外側)<br>／菌数 |                 |                 |                 | 第2段階(内側)<br>／菌数 |                 |                 |   | 備考<br>(AN=配列番号) |
|--------------|---|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|
|              |   |                      | 10 <sup>7</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>5</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>1</sup> | 1 |                 |
| (AA)+(aa)    | <i>Vibrio cholerae</i>                            | toxin:CTA            | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                 |
| (BB)+(bb)    | <i>Vibrio cholerae/mimicus</i>                    | Group 16S<br>rRNA    | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                 |
| (CC)+(cc)    | <i>Vibrio fluvialis</i>                           | 16S rRNA             | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                 |
| (DD)+(dd)    | <i>Vibrio</i><br><i>parahaemolyticus</i>          | Specific<br>16S rRNA | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                 |
| (EE)+(ee)    | <i>Vibrio</i><br><i>parahaemolyticus</i><br>group | haemolysin<br>(Tdh)  | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                 |
| (FF)+(ff)    | <i>Vibrio</i> spp.                                | Group 16S<br>rRNA    | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                 |
| (GG)+(gg)    | <i>Yersinia</i><br><i>enterocolitica</i>          | Group 16S<br>rRNA    | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                 |
| (HH)+(hh)    | <i>Yersinia</i><br><i>enterocolitica</i>          | Group 16S<br>rRNA    | ○               | ○               | ○               | ×               | ○               | ○               | ○               | × |                 |

【0078】また、特異性の試験は、表8及び表9に示す各微生物について同様に検出操作を行った。その実験の結果を表13乃至表19に示す。ここで、表中のそれぞれに項目に付された“○”は検出有りを示し、“×”は不検出を示す。さらに、“-”は未検討のものを示し

ている。これにより、(A)～(HH)の各プライマーセットを用いることによって、特異性の高い検出が可能なが示された。すなわち、本発明に微生物検出用のプライマーセットは、微生物の属、群、及び種のレベルで特異的に検出することが可能であること、などが確認で

きた。なお、表中の”AN”は、検出の際に使用した各プライマーセットのそれぞれの配列番号を示している。

【0079】

【表13】

実験結果(特異性試験)－1

|       | 供試微生物                       | プライマーセット |     |     |     |     |     |     |
|-------|-----------------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|       |                             | (A)      | (B) | (C) | (D) | (E) | (F) | (G) |
| (1)-1 | <i>A. hydrophila</i>        | ○        | ○   | －   | －   | －   | －   | －   |
| (1)-2 | <i>A. sobria</i>            | ×        | ○   | －   | －   | －   | －   | －   |
| (2)-1 | <i>B. cereus group</i>      | －        | －   | ○   | －   | －   | －   | －   |
| (3)   | <i>Bacteroides fragilis</i> | －        | －   | －   | ○   | －   | －   | －   |
| (4)-1 | <i>Campylobacter jejuni</i> | －        | －   | －   | －   | ○   | ○   | ○   |
| (4)-2 | <i>Campylobacter coli</i>   | －        | －   | －   | －   | ×   | ○   | ○   |
| (4)-3 | <i>Campylobacter spp.</i>   | －        | －   | －   | －   | ×   | ×   | ○   |

【0080】

【表14】

実験結果(特異性試験)－2

|       | 供試微生物               | プライマーセット |      |      |      |      |      |      |      |      |       |
|-------|---------------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
|       |                     | (H1)     | (H2) | (H3) | (H4) | (H5) | (H6) | (H7) | (H8) | (H9) | (H10) |
| (5)-1 | <i>C. botulinum</i> | ○        | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ○    | ×    | ×     |
| (5)-2 | <i>C. botulinum</i> | ×        | ○    | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ○    | ×    | ×     |
| (5)-3 | <i>C. botulinum</i> | ×        | ×    | ○    | ○    | ×    | ×    | ×    | ×    | ○    | ×     |
| (5)-4 | <i>C. botulinum</i> | ×        | ×    | ×    | ×    | ○    | ×    | ×    | ×    | ×    | ×     |
| (5)-5 | <i>C. botulinum</i> | ×        | ×    | ×    | ×    | ×    | ○    | ×    | ×    | ×    | ○     |
| (5)-6 | <i>C. botulinum</i> | ×        | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ○    | ×    | ×    | ○     |

※H1=AN15,16 H2=AN17,18 H3=AN19,20 H4=AN21,22 H5=AN23,24  
H6=AN25,26 H7=AN27,28 H8=AN29,30 H9=AN31,32 H10=AN33,34

【0081】

【表15】

実験結果(特異性試験)－3

|      | 供試微生物                         | プライマーセット |      |      |      |      |      |     |     |
|------|-------------------------------|----------|------|------|------|------|------|-----|-----|
|      |                               | (I)      | (J1) | (J2) | (J3) | (K1) | (K2) | (L) | (M) |
| (6)  | <i>C. butyricum</i>           | ○        | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | －   | －   |
| (7)  | <i>C. difficile</i>           | ×        | ○    | ○    | ○    | ×    | ×    | －   | －   |
| (8)  | <i>C. perfringens</i>         | ×        | ×    | ×    | ×    | ○    | ○    | －   | －   |
| (9)  | <i>Cryptosporidium parvum</i> | ×        | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ○   | －   |
| (10) | <i>Entamoeba histolytica</i>  | －        | －    | －    | －    | －    | －    | －   | ○   |

※J1=AN37,38 J2=AN39,40 J3=AN41,42  
K1=AN43,44 K2=AN45,46

【0082】

【表16】

実験結果(特異性試験)－4

|        | 供試微生物                                  | プライマーセット |      |     |      |      |      |      |      |     |     |      |      |     |
|--------|--|----------|------|-----|------|------|------|------|------|-----|-----|------|------|-----|
|        |  | (N1)     | (N2) | (O) | (P1) | (P2) | (Q1) | (Q2) | (Q3) | (R) | (S) | (T1) | (T2) | (U) |
| (11)-1 | <i>E. Coli</i><br>( <i>EaggEC</i> )    | ○        | ×    | ×   | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ×   | —   | —    | —    | —   |
| (11)-2 | <i>E. Coli</i><br>( <i>EaggEC</i> )    | ×        | ○    | ×   | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ×   | —   | —    | —    | —   |
| (11)-3 | <i>E. Coli</i> ( <i>EIEC</i> )         | ×        | ×    | ○   | ×    | ×    | ×    | ×    | ×    | ×   | —   | —    | —    | —   |
| (11)-4 | <i>E. Coli</i> ( <i>EHEC</i> )         | ×        | ×    | ×   | ○    | ○    | ×    | ×    | ×    | ○   | —   | —    | —    | —   |
| (11)-5 | <i>E. Coli</i> ( <i>ETEC</i> )         | ×        | ×    | ×   | ×    | ×    | ○    | ×    | ×    | ×   | —   | —    | —    | —   |
| (11)-6 | <i>E. Coli</i> ( <i>ETEC</i> )         | ×        | ×    | ×   | ×    | ×    | ×    | ○    | ○    | ×   | —   | —    | —    | —   |
| (12)   | <i>Giardia lamblia</i><br>group        | —        | —    | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —   | —   | —    | —    | —   |
| (13)   | <i>Listeria</i><br><i>monocytogene</i> | —        | —    | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —   | —   | ○    | ○    | —   |
| (14)   | <i>P. shigelloides</i>                 | —        | —    | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —   | —   | —    | —    | ○   |

※N1=AN51,52 N2=AN53,54  
P1=AN57,58 P2=AN59,60  
Q1=AN61,62 Q2=AN63,64 Q3=AN65,66  
T1=AN71,72 T2=AN73,74

【0083】

【表17】

実験結果(特異性試験)－5

|      | 供試微生物   | プライマーセット |      |     |     |
|------|---|----------|------|-----|-----|
|      |   | (V1)     | (V2) | (W) | (X) |
| (15) | <i>Salmonella</i> spp.<br>( <i>Salmonella typhimurium</i> ) | ○        | ○    | ×   | —   |
| (15) | <i>Salmonella</i> spp.<br>( <i>Salmonella enteritidis</i> ) | ○        | ○    | ×   | —   |
| (16) | <i>Salmonella typhi</i>                                     | ○        | ○    | ○   | —   |
| (17) | <i>Shigella flexneri</i>                                    | —        | —    | —   | ○   |

※V1=AN77,78 V2=AN79,80

【0084】

【表18】

実験結果(特異性試験)－6

|        | 供試微生物  | プライマーセット |      |      |      |      |      |      |
|--------|--|----------|------|------|------|------|------|------|
|        |  | (Y1)     | (Y2) | (Y3) | (Y4) | (Y5) | (Z1) | (Z2) |
| (18)-1 | <i>Staphylococcus aureus</i>                               | ○        | ×    | ×    | ×    | ×    | —    | —    |
| (18)-2 | <i>Staphylococcus aureus</i>                               | ×        | ○    | ×    | ×    | ×    | —    | —    |
| (18)-3 | <i>Staphylococcus aureus</i>                               | ×        | ×    | ○    | ×    | ×    | —    | —    |
| (18)-4 | <i>Staphylococcus aureus</i>                               | ×        | ×    | ×    | ○    | ×    | —    | —    |
| (18)-5 | <i>Staphylococcus aureus</i>                               | ×        | ×    | ×    | ×    | ○    | —    | —    |
| (19)   | <i>Tropheryma whippellii</i><br>( <i>Whipple Disease</i> ) | —        | —    | —    | —    | —    | —    | —    |

※Y1=AN85,86 Y2=AN87,88 Y3=AN89,90 Y4=AN91,92 Y5=AN93,94  
Z1=AN95,96 Z2=AN97,98

【0085】

【表19】

実験結果(特異性試験)-7

|        | 供試微生物                      | プライマーセット |      |      |      |      |      |      |      |
|--------|----------------------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|
|        |                            | (AA)     | (BB) | (CC) | (DD) | (EE) | (FF) | (GG) | (HH) |
| (20)-1 | <i>V. cholerae</i>         | ○        | ○    | ×    | ×    | ×    | ○    | -    | -    |
| (20)-2 | <i>V. cholerae/mimicus</i> | ×        | ○    | ×    | ×    | ×    | ○    | -    | -    |
| (20)-3 | <i>V. fluvialis</i>        | ×        | ×    | ○    | ×    | ×    | ○    | -    | -    |
| (20)-4 | <i>V. parahaemolyticus</i> | ×        | ×    | ×    | ○    | ○    | ○    | -    | -    |
| (20)-5 | <i>Y. enterocolitica</i>   | -        | -    | -    | -    | -    | -    | ○    | ○    |

## 【0086】

【発明の効果】請求項1に記載の発明に係る微生物の検出方法によれば、複数種類の微生物の遺伝子を共通の温度サイクル条件で増幅することができる。そして、増幅産物の生成の有無によって微生物の存在を確認することができるとともに、その同定が増幅反応のレベルで可能である。また、増幅反応の操作を共通化できるため、測定操作の簡便性や経済性の点でも有利である。特に、人体に下痢症状などの食中毒の原因菌となる多種類の病原性微生物を対象とする検出系を構築することができる。この検出系では各微生物を高感度で検出することができ、しかもその検出操作を迅速かつ簡便に行うことがで

きる。

【0087】請求項2に記載の発明に係る微生物の検出方法によれば、請求項1に記載の発明の効果に加え、病原性微生物の検出系において、その感度や特異性をさらに向上させることができる。

【0088】請求項3に記載の発明に係る微生物の検出用プライマーセットによれば、これらのプライマーセットを用いて病原性微生物の検出系を構築することにより、請求項1または2に記載の発明の効果を奏することができる。

## 【0089】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110>; RAKAN Co., Ltd.

Gifu University

<120>; Method for detecting microorganisms.

<130>; P01108

<140>;

<141>;

<160>; 228

<170>; PatentIn Ver. 2.1

<210>; 1

<211>; 18

<212>; DNA

<213>; Artificial Sequence

<220>;

<223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for *Aeromonas hydrophila*

<400>; 1

gcgtctgaca gcgaagtg

18

<210>; 2

<211>; 18

<212>; DNA

<213>; Artificial Sequence

<220>;

<223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for *Aeromonas hydrophila*

<400>; 2

tgactgtgtc catcgtgc

18

<;210>; 3  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Aeromonas spp.  
 <;400>; 3  
 gggaagtag cttgctac 18

<;210>; 4  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Aeromonas spp.  
 <;400>; 4  
 ctttctcct cgtgaaa 18

<;210>; 5  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Bacillus cereus group  
 <;400>; 5  
 caaatctat gaatgcct 18

<;210>; 6  
 <;211>; 22  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Bacillus cereus group  
 <;400>; 6  
 ctcttaattt agttaattct tc 22

<;210>; 7  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Bacteroides fragilis  
 <;400>; 7  
 cgaagacgt gtatgtatt 20



<;210>; 8  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Bacteroides fragilis*  
 <;400>; 8  
 cgcccagtat atgacctagt 20

<;210>; 9  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Campylobacter jejuni*  
 <;400>; 9  
 gatgtacact agttgttggg 20

<;210>; 10  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Campylobacter jejuni*  
 <;400>; 10  
 aagctagcac cctcatat 18

<;210>; 11  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Campylobacter jejuni/coli*  
 <;400>; 11  
 acgatgaagc ttctagct 18

<;210>; 12  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Campylobacter jejuni/coli*  
 <;400>; 12  
 agtttaatgg ttaagcca 18

<;210>; 13  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Campylobacter spp.  
 <;400>; 13  
 gtatagttaa tctgccctac 20

<;210>; 14  
 <;211>; 19  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Campylobacter spp.  
 <;400>; 14  
 tattccttag gtaccgtca 19

<;210>; 15  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 15  
 agttagagct agaaaaactg 20

<;210>; 16  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 16  
 acttgaaatt aaagaattca 20

<;210>; 17  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 17  
 ctgtaaggct aatacagatt 20

<;210>; 18  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 18  
 aataactaagt tagggttttt 20

<;210>; 19  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 19  
 ttcagatcct gttgataata 20

<;210>; 20  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 20  
 tcaaaaagtat taattggagt 20

<;210>; 21  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 21  
 ggtattatatt tgaaaatgat 20

<;210>; 22  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 22  
 ggttttaaca atacttctga 20

<;210>: 23  
 <;211>: 20  
 <;212>: DNA  
 <;213>: Artificial Sequence  
 <;220>:  
 <;223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>: 23  
 tctttaattt ctacagcaat 20

<;210>: 24  
 <;211>: 20  
 <;212>: DNA  
 <;213>: Artificial Sequence  
 <;220>:  
 <;223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>: 24  
 ttattaagca tttagtttagc 20

<;210>: 25  
 <;211>: 20  
 <;212>: DNA  
 <;213>: Artificial Sequence  
 <;220>:  
 <;223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>: 25  
 ttataatgat cctgttaatg 20

<;210>: 26  
 <;211>: 20  
 <;212>: DNA  
 <;213>: Artificial Sequence  
 <;220>:  
 <;223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>: 26  
 atctggagta ttatcattcc 20

<;210>: 27  
 <;211>: 20  
 <;212>: DNA  
 <;213>: Artificial Sequence  
 <;220>:  
 <;223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>: 27  
 ctgtacttca acaaactgta 20

<;210>; 28  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 28  
 gtgtagttga aaaccagttt 20

<;210>; 29  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 29  
 gctagaaaaa ctgatacgg 20

<;210>; 30  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 30  
 ttttttatta gattttggtg 20

<;210>; 31  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 31  
 cgggctagaa aaactaatac 20

<;210>; 32  
 <;211>; 22  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 32  
 tatatccata aggaaatgga at 22

<;210>; 33  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 33  
 cttttatgga acaatgtatt 20

<;210>; 34  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium botulinum  
 <;400>; 34  
 ataaatttcc caaccacaat 20

<;210>; 35  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium butyricum  
 <;400>; 35  
 gttgtcaaga attttataaa 20

<;210>; 36  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium butyricum  
 <;400>; 36  
 aatagtatgt cttggctacc 20

<;210>; 37  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium difficile  
 <;400>; 37  
 gtctttcaag tcaggagt 18

<;210>; 38  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium difficile  
 <;400>; 38  
 actcttgcca ggtactt 18

<;210>; 39  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium difficile  
 <;400>; 39  
 agaagagtta ataaaactcg 20

<;210>; 40  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium difficile  
 <;400>; 40  
 tcactatcat accacagttt 20

<;210>; 41  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium difficile  
 <;400>; 41  
 gtcagagaat actgtagtcg 20

<;210>; 42  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Clostridium difficile  
 <;400>; 42  
 ttgctgattc tactacagtt 20

<;210>; 43  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium perfringens  
 <;400>; 43  
 taacacgtgg gtaacctg 18

<;210>; 44  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium perfringens  
 <;400>; 44  
 tccttgggta cgcgcatt 18

<;210>; 45  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium perfringens  
 <;400>; 45  
 tttaagtgat ggattatatg 20

<;210>; 46  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Clostridium perfringens  
 <;400>; 46  
 tcagagatat taccatgaga 20

<;210>; 47  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Cryptosporidium parvum  
 <;400>; 47  
 ctgctgtaca agctgctatc 20



<;210>; 48  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Cryptosporidium parvum*  
 <;400>; 48  
 caacagcaga cacattcaag 20

<;210>; 49  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Entamoeba histolytica*  
 <;400>; 49  
 tcaagagaaa gaatgttgta 20

<;210>; 50  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Entamoeba histolytica*  
 <;400>; 50  
 cctactcctc cttactttt 20

<;210>; 51  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Escherichia coli*(EaggEC)  
 <;400>; 51  
 ctggcgaaag actgtatcat 20

<;210>; 52  
 <;211>; 22  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Escherichia coli*(EaggEC)  
 <;400>; 52  
 caatgtatag aaatccgctg tt 22

<;210>; 53  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(EaggEC)  
 <;400>; 53  
 gaacgataatc etcatcgcct 20

<;210>; 54  
 <;211>; 26  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(EaggEC)  
 <;400>; 54  
 atcgctttca ggtcgcgagt gacggc 26

<;210>; 55  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(EIEC)  
 <;400>; 55  
 tataatctact cttgatgcca 20

<;210>; 56  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(EIEC)  
 <;400>; 56  
 ttttattttct tcctttaata 20

<;210>; 57  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(EHEC)  
 <;400>; 57  
 tgtcagaggg atagatcc 18

<;210>; 58  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(EHEC)  
 <;400>; 58  
 aaatccccc tgtatttg 18

<;210>; 59  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(EHEC)  
 <;400>; 59  
 tggagttcag tggtaataca 20

<;210>; 60  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(EHEC)  
 <;400>; 60  
 tgtattactt tcccataatg 20

<;210>; 61  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 61  
 cagatatatg gatggtatcg 20

<;210>; 62  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 62  
 ctgcctctta acttttgatt 20

<;210>; 63  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 63  
 tctgtattgt ctttttcacc 20

<;210>; 64  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 64  
 agcaggatta caacacaatt 20

<;210>; 65  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 65  
 ccggaggtaa tatgaaga 18

<;210>; 66  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 66  
 atttattcaa caaagcaaca 20

<;210>; 67  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for Escherichia coli  
 <;400>; 67  
 aacattgatt atgcttagtg 20

<;210>; 68  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli  
 <;400>; 68  
 tagtcagttt attcgtgtga 20

<;210>; 69  
 <;211>; 17  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Giardia lamblia group  
 <;400>; 69  
 gacgtctctc ccaagga 17

<;210>; 70  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Giardia lamblia group  
 <;400>; 70  
 gaattaccgc ggctgctg 18

<;210>; 71  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Listeria monocytogenes  
 <;400>; 71  
 atcgataagt atatacaagg 20

<;210>; 72  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Listeria monocytogenes  
 <;400>; 72  
 attccatctt tccactaatg 20

<;210>; 73  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Listeria monocytogenes*  
 <;400>; 73  
 taccaatagc acaacaaa 18

<;210>; 74  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Listeria monocytogenes*  
 <;400>; 74  
 ctggatatgt taggctcg 18

<;210>; 75  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Plesiomonas shigelloides*  
 <;400>; 75  
 taacacagag gagcttgc 18

<;210>; 76  
 <;211>; 19  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Plesiomonas shigelloides*  
 <;400>; 76  
 atgccactag gtattaact 19

<;210>; 77  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Salmonella* spp.  
 <;400>; 77

gccatgctgt tcgatgatat

20

&lt;;210&gt;; 78

&lt;;211&gt;; 20

&lt;;212&gt;; DNA

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for Salmonella spp.

&lt;;400&gt;; 78

ttactcactc cctgaatctg

20

&lt;;210&gt;; 79

&lt;;211&gt;; 20

&lt;;212&gt;; DNA

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for Salmonella spp.

&lt;;400&gt;; 79

ttctacattg acagaatcct

20

&lt;;210&gt;; 80

&lt;;211&gt;; 20

&lt;;212&gt;; DNA

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for Salmonella spp.

&lt;;400&gt;; 80

tcaccttga taaacttcac

20

&lt;;210&gt;; 81

&lt;;211&gt;; 20

&lt;;212&gt;; DNA

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for Salmonella typhi

&lt;;400&gt;; 81

attaggttat ttcagcataa

20

&lt;;210&gt;; 82

&lt;;211&gt;; 20

&lt;;212&gt;; DNA

&lt;;213&gt;; Artificial Sequence

&lt;;220&gt;;

&lt;;223&gt;; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for Salmonella typhi

<;400>; 82  
 ttactatat ccttacggtt 20

<;210>; 83  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Shigella flexneri*  
 <;400>; 83  
 taaatggaga aattatttca 20

<;210>; 84  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Shigella flexneri*  
 <;400>; 84  
 atggtcatat tgctaccatt 20

<;210>; 85  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Staphylococcus aureus*  
 <;400>; 85  
 gcaatcttaa acaaatttat 20

<;210>; 86  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Staphylococcus aureus*  
 <;400>; 86  
 tatttttctt gtaaataacg 20

<;210>; 87  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Staphylococcus aureus*



<;400>; 87  
gaaaatatga aagttttgta 20

<;210>; 88  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
<;400>; 88  
aataaatattt taccatcttc 20

<;210>; 89  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
<;400>; 89  
gatgatcatt atgtatcagc 20

<;210>; 90  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
<;400>; 90  
gttcttgagc tgttacactt 20

<;210>; 91  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
<;400>; 91  
atttaacatt cttattgcat 20

<;210>; 92  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for *Staphylococcus aureus*  
 <400> 92  
 atcttatagg gtaaacaatct 20

<210> 93  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for *Staphylococcus aureus*  
 <400> 93  
 atcttaggca aatttattat 20

<210> 94  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for *Staphylococcus aureus*  
 <400> 94  
 ttataaaac caaatatttc 20

<210> 95  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for *Tropheryma whippelii*  
 (Whipple Disease)  
 <400> 95  
 ttgtccctg tgattagt 18

<210> 96  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for *Tropheryma whippelii*  
 (Whipple Disease)  
 <400> 96  
 gccaaaagag gttacaa 18

<210> 97  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Tropheryma whippelii  
     (Whipple Disease)  
 <;400>; 97  
 ccctaacttt gggataac 18

<;210>; 98  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Tropheryma whippelii  
     (Whipple Disease)  
 <;400>; 98  
 ttctctgcagg taccgtca 18

<;210>; 99  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Vibrio cholerae  
 <;400>; 99  
 gaggtactca aatgaatac 20

<;210>; 100  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Vibrio cholerae  
 <;400>; 100  
 attactcatc gatgatcttg 20

<;210>; 101  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Vibrio cholerae/mimicus  
 <;400>; 101  
 taaccattgg aaacgatg 18

<;210>; 102

<;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio cholerae/mimicus*  
 <;400>; 102  
 aatgattaag gtattaactt 20

<;210>; 103  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio fluvialis*  
 <;400>; 103  
 cagcgacaac attgaacctt 20

<;210>; 104  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio fluvialis*  
 <;400>; 104  
 agctaacgtc aaaagata 18

<;210>; 105  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio parahaemolyticus*  
 <;400>; 105  
 ggaaacgagt tatctgaa 18

<;210>; 106  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio parahaemolyticus*  
 <;400>; 106  
 gtcaaatgat ggtgctat 18

<;210>; 107

<;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio parahaemolyticus*  
         group  
 <;400>; 107  
 gttctgatga gatattgttt 20

<;210>; 108  
 <;211>; 22  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio parahaemolyticus*  
         group  
 <;400>; 108  
 tatatccata aggaaatgga at 22

<;210>; 109  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio* spp.  
 <;400>; 109  
 taaccattgg aaacgatg 18

<;210>; 110  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio* spp.  
 <;400>; 110  
 cttacaacac cacctgca 18

<;210>; 111  
 <;211>; 21  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Yersinia enterocolitica*  
 <;400>; 111  
 gtgagtaatg tctgggaaac t 21

<;210>; 112  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Yersinia enterocolitica*  
 <;400>; 112  
 gtaacgtcaa tccaacaa 18

<;210>; 113  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Yersinia enterocolitica*  
     group  
 <;400>; 113  
 ataccgcata acgtcttc 18

<;210>; 114  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Yersinia enterocolitica*  
     group  
 <;400>; 114  
 taacgtcaat ccaacaac 18

<;210>; 115  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Aeromonas hydrophila*  
 <;400>; 115  
 tgctggcgac gctgattg 18

<;210>; 116  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Aeromonas hydrophila*

<;400>; 116  
 tcttgctgc ctgcatgc 18

<;210>; 117  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Aeromonas spp.  
 <;400>; 117  
 ataacagttg gaaacgactg 20

<;210>; 118  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Aeromonas spp.  
 <;400>; 118  
 ggctgcatca gggtttcc 18

<;210>; 119  
 <;211>; 22  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Bacillus cereus group  
 <;400>; 119  
 ctgttacttg ggatacgaaa gt 22

<;210>; 120  
 <;211>; 22  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Bacillus cereus group  
 <;400>; 120  
 tctattagtt gttgtgcata ct 22

<;210>; 121  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Bacteroides fragilis

<;400>; 121  
cgaactcggg ttatgcagtt 20

<;210>; 122  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Bacteroides fragilis  
<;400>; 122  
ccgaagccgt attcacatta 20

<;210>; 123  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Campylobacter jejuni  
<;400>; 123  
catctcagta atgcagctaa cg 22

<;210>; 124  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Campylobacter jejuni  
<;400>; 124  
gcacctcat atctctataa gg 22

<;210>; 125  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Campylobacter jejuni/coli  
<;400>; 125  
cctgcttaac acaagttgag 20

<;210>; 126  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized



Primer Sequence for *Campylobacter jejuni/coli*

<400>: 126  
cgtcagaatt cttccctaag 20

<210>: 127  
<211>: 20  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence  
<220>:  
<223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for *Campylobacter* spp.

<400>: 127  
cggtgtagga tgagactata 20

<210>: 128  
<211>: 20  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence  
<220>:  
<223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for *Campylobacter* spp.

<400>: 128  
ccagtgtgac tgatcatcct 20

<210>: 129  
<211>: 20  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence  
<220>:  
<223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for *Clostridium botulinum*

<400>: 129  
gccagagaga tattatggcg 20

<210>: 130  
<211>: 20  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence  
<220>:  
<223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for *Clostridium botulinum*

<400>: 130  
ttccccagcg ttagtactat 20

<210>: 131  
<211>: 20  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence  
<220>:  
<223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 131  
atcaagttcc cggtaacggt 20

<;210>; 132  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 132  
ttgaatcttg aagcgctgat 20

<;210>; 133  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 133  
cactagctaa tgagcctgaa 20

<;210>; 134  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 134  
gggtatatct gtcgaaagtc 20

<;210>; 135  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 135  
aagtctgcaa gatggattgg 20

<;210>; 136  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 136  
cccagtaaag cttaattcct 20

<;210>; 137  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 137  
caagtaccat tccatttcct 20

<;210>; 138  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 138  
accattctca gcatcattct 20

<;210>; 139  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 139  
gattttcatc cgcctacttc 20

<;210>; 140  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 140  
tccctcctga aagattatta 20

<;210>; 141  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 141  
ctctactaac cgcaaccagt 20

<;210>; 142  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 142  
acggatgcag tcgatgatag 20

<;210>; 143  
<;211>; 24  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 143  
ctaattttct ttcacaagat agtg 24

<;210>; 144  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 144  
tatatccata aggaaatgga at 22

<;210>; 145  
<;211>; 24  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 145  
ctaattttct ttcacaagat agtg 24

<;210>; 146  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium botulinum

<;400>; 146  
tataatccata aggaaatgga at 22

<;210>; 147  
<;211>; 21  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium botulinum  
<;400>; 147  
gattatgcaa aatagtttta g 21

<;210>; 148  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium botulinum  
<;400>; 148  
tttctcaacc aaaaataaat tg 22

<;210>; 149  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium butyricum  
<;400>; 149  
caagattttc atccgcgcct ac 22

<;210>; 150  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium butyricum  
<;400>; 150  
gcatcaccaa tatggaattg 22

<;210>; 151  
<;211>; 22  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

## Primer Sequence for Clostridium difficile

<;400>; 151  
ctcttgaaac tgggagactt ga 22

<;210>; 152  
<;211>; 18  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium difficile

<;400>; 152  
taacccccga acacctag 18

<;210>; 153  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium difficile

<;400>; 153  
cttcaagcag aaatagagca 20

<;210>; 154  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium difficile

<;400>; 154  
gccattgtt ttatgtattc 20

<;210>; 155  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Clostridium difficile

<;400>; 155  
tctgtagaa ataaagcctt 20

<;210>; 156  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized

Primer Sequence for *Clostridium difficile*

<;400>; 156  
gtgtttatca aaaatgcatt 20

<;210>; 157  
<;211>; 21  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for *Clostridium perfringens*

<;400>; 157  
cgcataatgt tgaaagatgg c 21

<;210>; 158  
<;211>; 18  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for *Clostridium perfringens*

<;400>; 158  
acgcacgctc gccttggt 18

<;210>; 159  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for *Clostridium perfringens*

<;400>; 159  
ggagatggtt ggatattagg 20

<;210>; 160  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for *Clostridium perfringens*

<;400>; 160  
ggaccagcag ttgtagatac 20

<;210>; 161  
<;211>; 20  
<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Cryptosporidium parvum*  
 <;400>; 161  
 atggtgagca atcctctgcc 20

<;210>; 162  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Cryptosporidium parvum*  
 <;400>; 162  
 ccgaggagat ggttatcctt 20

<;210>; 163  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Entamoeba histolytica*  
 <;400>; 163  
 gcacaaattg gaaaagaagc 20

<;210>; 164  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Entamoeba histolytica*  
 <;400>; 164  
 tcacaccatg cttgatgaca 20

<;210>; 165  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Escherichia coli*(EaggEC)  
 <;400>; 165  
 tagggtagg gcagtatata 20

<;210>; 166  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;



<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Escherichia coli(EaggEC)  
 <;400>; 166  
 ctctcgagca tcaacatcag 20

<;210>; 167  
 <;211>; 21  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Escherichia coli(EaggEC)  
 <;400>; 167  
 tgccatcaac acagtatatc c 21

<;210>; 168  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Escherichia coli(EaggEC)  
 <;400>; 168  
 agtccttcca tgacacgaag 20

<;210>; 169  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Escherichia coli(EIEC)  
 <;400>; 169  
 caaaagagca tagcatccga 20

<;210>; 170  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for Escherichia coli(EIEC)  
 <;400>; 170  
 cgcgattgga aatagagata 20

<;210>; 171  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Escherichia coli(EHEC)

<;400>; 171

ctacggctta ttgtgaacg

20

<;210>; 172

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Escherichia coli(EHEC)

<;400>; 172

gaggttcac tatgcacat

20

<;210>; 173

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Escherichia coli(EHEC)

<;400>; 173

cactgtcac gcagaagcct

20

<;210>; 174

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Escherichia coli(EHEC)

<;400>; 174

gccagttatc tgacattctg

20

<;210>; 175

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)

<;400>; 175

cagggaatat agagaccggt

20

<;210>; 176

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 176  
 gtgctcagat tctgggtctc 20

<;210>; 177  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 177  
 cgctcaggat gctaaaccag 20

<;210>; 178  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli(ETEC)  
 <;400>; 178  
 attcatgctt tcaggaccac 20

<;210>; 179  
 <;211>; 21  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli  
 <;400>; 179  
 ctgtattgtc tttttcacct t 21

<;210>; 180  
 <;211>; 21  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli  
 <;400>; 180  
 agacatcatc agaatacagaa c 21

<;210>; 181  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli  
 <;400>; 181  
 tgatagctat cagaatcgcc 20

<;210>; 182  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Escherichia coli  
 <;400>; 182  
 caagaggtgc cgaacctaaa 20

<;210>; 183  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Giardia lamblia group  
 <;400>; 183  
 ccctgctagc cggacacc 18

<;210>; 184  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Giardia lamblia group  
 <;400>; 184  
 atgtgcgggc cgtctctc 18

<;210>; 185  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Listeria monocytogenes  
 <;400>; 185  
 ataccacgga gatgcagtga 20

<;210>; 186  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Listeria monocytogenes*  
 <;400>; 186  
 cttgattagt cattcctggc 20

<;210>; 187  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Listeria monocytogenes*  
 <;400>; 187  
 catccatggc accaccaa 18

<;210>; 188  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Listeria monocytogenes*  
 <;400>; 188  
 cggcacattt gtcactgc 18

<;210>; 189  
 <;211>; 22  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Plesiomonas shigelloides*  
 <;400>; 189  
 gataactacg ggaaactgta gc 22

<;210>; 190  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Plesiomonas shigelloides*  
 <;400>; 190  
 ccagtgtagc tggcattct 20

<;210>; 191  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Salmonella spp.  
 <;400>; 191  
 aaatcgcttc cagctgatcc 20

<;210>; 192  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Salmonella spp.  
 <;400>; 192  
 gcgaatgaga cgcttaagcg 20

<;210>; 193  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Salmonella spp.  
 <;400>; 193  
 ttgaagccga tgccggtgaa 20

<;210>; 194  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Salmonella spp.  
 <;400>; 194  
 gcgcagcatc cgcacata 20

<;210>; 195  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Salmonella typhi  
 <;400>; 195  
 tcatcatttc tggcctccga 20

<;210>; 196  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Salmonella typhi  
 <;400>; 196  
 cgcatcgaaa acagcaataa 20

<;210>; 197  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Shigella flexneri  
 <;400>; 197  
 caacaaaggg actatttcg 20

<;210>; 198  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Shigella flexneri  
 <;400>; 198  
 agccatcata accataaccg 20

<;210>; 199  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 199  
 tttacagat cattcgtggt 20

<;210>; 200  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 200  
 tgatcggcac tttttctct 20

<;210>; 201  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 201  
 tatgataatg ttcgagtcga 20

<;210>; 202  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 202  
 cccgaacagt aatacttcta 20

<;210>; 203  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 203  
 thtagataaa tttttggcac 20

<;210>; 204  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 204  
 caaagtgggtt tccttcattgt 20

<;210>; 205  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 205  
 ctcttttaaa cgttaaagcc 20

<;210>; 206  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence



<;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 206  
 ccatttcttt tgaattgaag 20

<;210>; 207  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 207  
 ttttcacagg tcatccatgg 20

<;210>; 208  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Staphylococcus aureus  
 <;400>; 208  
 cggtaaatcg gttattatca 20

<;210>; 209  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Tropheryma whippelii  
     (Whipple Disease)  
 <;400>; 209  
 cctaactttg ggataacttc 20

<;210>; 210  
 <;211>; 19  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Tropheryma whippelii  
     (Whipple Disease)  
 <;400>; 210  
 ggctacccgt cgatgcctt 19

<;210>; 211  
 <;211>; 20

<;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Tropheryma whippelii  
     (Whipple Disease)  
 <;400>; 211  
 ataccataaata cgacccatga 20

<;210>; 212  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Tropheryma whippelii  
     (Whipple Disease)  
 <;400>; 212  
 gtaccgtcac ttctgcttct 20

<;210>; 213  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Vibrio cholerae  
 <;400>; 213  
 tgcaagagga actcagacgg 20

<;210>; 214  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Vibrio cholerae  
 <;400>; 214  
 cccacctaata gcagaaactt 20

<;210>; 215  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for Vibrio cholerae/mimicus  
 <;400>; 215  
 taataaccgca taacctcgca 20

<;210>; 216  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio cholerae/mimicus*  
 <;400>; 216  
 gctgcatcag gcttgcgc 18

<;210>; 217  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio fluvialis*  
 <;400>; 217  
 atgcctggga aattgcctg 20

<;210>; 218  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio fluvialis*  
 <;400>; 218  
 gatacctcct tcctcactgc 20

<;210>; 219  
 <;211>; 20  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio parahaemolyticus*  
 <;400>; 219  
 tgatagcttc ggettaaaga 20

<;210>; 220  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
     Primer Sequence for *Vibrio parahaemolyticus*  
 <;400>; 220  
 ccaccttct caggetg 18

<;210>; 221  
 <;211>; 22  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Vibrio parahaemolyticus* group  
 <;400>; 221  
 tatatccata aggaaatgga at 22

<;210>; 222  
 <;211>; 23  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Vibrio parahaemolyticus* group  
 <;400>; 222  
 gctacagaat tataggaatg ttg 23

<;210>; 223  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Vibrio* spp.  
 <;400>; 223  
 aacgatggct aataccgc 18

<;210>; 224  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Vibrio* spp.  
 <;400>; 224  
 catcaggctt gcgccat 18

<;210>; 225  
 <;211>; 18  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence: Synthesized  
           Primer Sequence for *Yersinia enterocolitica*  
 <;400>; 225  
 taccgcataa cgtcttcg 18

<210>: 226  
 <211>: 18  
 <212>: DNA  
 <213>: Artificial Sequence  
 <220>:  
 <223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for *Yersinia enterocolitica*  
 <400>: 226  
 gttattggcc ttctcct

18

<210>: 227  
 <211>: 18  
 <212>: DNA  
 <213>: Artificial Sequence  
 <220>:  
 <223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for *Yersinia enterocolitica* group  
 <400>: 227  
 ataacgtctt cggaccaa

18

<210>: 228  
 <211>: 20  
 <212>: DNA  
 <213>: Artificial Sequence  
 <220>:  
 <223>: Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 Primer Sequence for *Yersinia enterocolitica* group  
 <400>: 228  
 aacgtattaa gttattggcc

20

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施形態における微生物の検出操作の概要を示す説明図である。

## 【符号の説明】

R1a, R1b, R1c, ... PCR反応液 (第1段階)

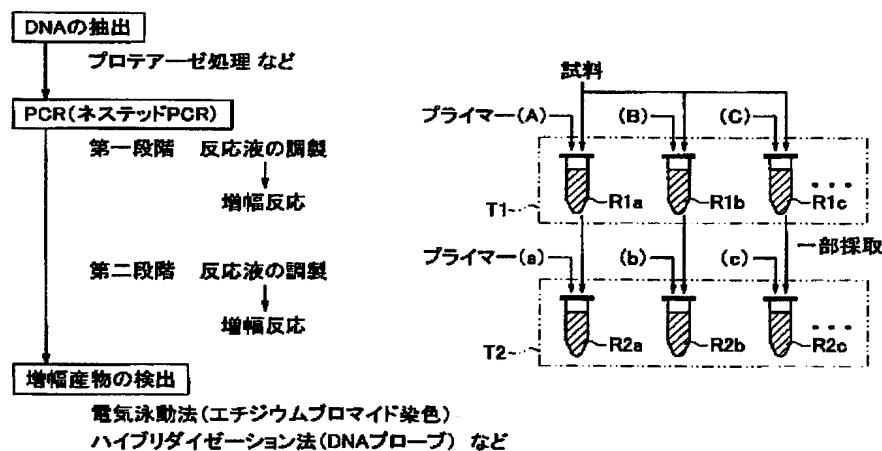
階)

R2a, R2b, R2c, ... PCR反応液 (第2段階)

T1 温度サイクル条件 (第1段階)

T2 温度サイクル条件 (第2段階)

【図1】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA12 HA19 HA20  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ05  
QR08 QR32 QR42 QR62 QS25  
QS34 QX01